

## Promotor zur epidermisspezifischen Transgenexpression in Pflanzen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Promotorregionen, unter deren Kontrolle  
Transgene in Pflanzen epidermisspezifisch exprimiert werden können. Weiterhin  
betrifft die Erfindung rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die diese  
Promotorregionen umfassen und transgene Pflanzen und Pflanzenzellen, die mit  
diesen Nukleinsäuremolekülen transformiert wurden, sowie Verfahren zu deren  
10 Herstellung. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Nukleinsäuremoleküle  
umfassend einen erfindungsgemäßen Promotor und Nukleinsäuresequenzen bzw.  
Transgene, die Pathogenresistenz vermitteln können sowie mit diesen Nukleinsäure-  
molekülen transformierte Pflanzen und Pflanzenzellen und Verfahren zu deren  
Herstellung.

15

Als Promotoren werden allgemein diejenigen DNA-Bereiche eines Gens bezeichnet,  
die stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes liegen und durch die der  
Initiationspunkt und die Initiationshäufigkeit der Transkription und somit die  
Expressionsstärke und das Expressionsmuster des kontrollierten Gens festgelegt  
20 werden. An die Promotoren binden die RNA-Polymerase und spezifische, die RNA-  
Polymerase aktivierende Transkriptionsfaktoren, um die Transkription zusammen  
mit dem basalen Transkriptionskomplex zu initiieren. Die Wirksamkeit der Promo-  
toren wird häufig durch zusätzliche DNA-Sequenzen, die Enhancer-Sequenzen,  
gesteigert und reguliert, deren Position im Gegensatz zu der der Promotoren nicht  
25 festgelegt ist. Diese regulatorischen Elemente können stromaufwärts, stromabwärts  
oder in einem Intron des zu exprimierenden Gens liegen.

In der rekombinanten DNA-Technologie werden Promotoren in Expressionsvektoren  
eingesetzt, um die Expression eines Transgens zu steuern, das in der Regel nicht das  
30 natürlicherweise durch den Promotor regulierte Gen ist. Dabei kommt es wesentlich  
auf die Spezifität des Promotors an, die bestimmt, zu welchem Zeitpunkt, in welchen  
Gewebetypen und in welcher Intensität ein gentechnisch übertragenes Gen  
exprimiert wird.

BEST AVAILABLE COPY

In der Pflanzenzucht wird die rekombinante DNA-Technologie häufig eingesetzt, um bestimmte nützliche Eigenschaften auf Nutzpflanzen zu übertragen, was zu einem höheren Ertrag, z. B. durch erhöhte Pathogenresistenz, oder zu verbesserten Eigenschaften der Ernteprodukte führen soll. Dabei ist es häufig wünschenswert, dass das übertragene Gen nicht ubiquitär exprimiert wird, sondern nur in den Geweben, in denen die Transgenaktivität gewünscht wird, da sich die Anwesenheit des Transgenprodukts in manchen Geweben negativ auf normale physiologische Prozesse auswirken kann. So konnte etwa gezeigt werden, dass die Überexpression einer anionischen Peroxidase unter der Kontrolle des ubiquitär wirkenden 35S-Promotors zum Welken von transgenen Tabakpflanzen führt, weil weniger Wurzelwachstum stattfindet und sich daher auch weniger Wurzelmasse bildet (Lagrimini et al. (1997) The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. Plant Mol Biol. 33 (5), S. 887-895). Die Überexpression der spi2-Peroxidase unter der Kontrolle des ebenfalls ubiquitär wirkenden Ubiquitin-Promotors führt zu einer reduzierten Epicotylbildung und einem reduzierten Längenwachstum verglichen mit Kontrollpflanzen (Elfstrand, M. et al. (2001) Overexpression of the endogenous peroxidase-like gene spi 2 in transgenic Norway spruce plants results in increased total peroxidase activity and reduced growth. Plant Cell Reports 20 (7), S. 596-603). Abgesehen von negativen Effekten auf physiologische Prozesse soll in der Resistenzzüchtung häufig vermieden werden, dass das Transgenprodukt auch in den geernteten Pflanzenteilen vorliegt.

Deshalb wurden in den vergangenen Jahren Promotoren isoliert, die entweder gewebespezifisch oder induzierbar wirken. Zu den gewebespezifischen Promotoren gehören etwa samen-, knollen- und fruchtspezifische Promotoren. Die induzierbaren Promotoren können beispielsweise durch chemische Induktion, durch Lichtinduktion oder andere Stimuli aktiviert werden.

Es ist auch wünschenswert, die Genexpression spezifisch in der Epidermis zu modulieren. Die Epidermis stellt das Abschlussgewebe der oberirdischen Organe höherer Pflanzen dar. Als solches bestehen die Aufgaben der Epidermis darin, einerseits den Wasser- und Stoffaustausch der Pflanze zu ermöglichen und  
5 andererseits das Eindringen von Pathogenen in die Pflanze zu verhindern. Durch eine veränderte Genexpression in der Epidermis mit Hilfe geeigneter Promotoren und von ihnen gesteuerter Gene könnten diese Funktionen gezielt moduliert werden. In dikotyledonen Pflanzen wurden epidermisspezifische Promotoren bereits beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass der Promotor des CER6- (CUT1-) Gens  
10 aus Arabidopsis, das für ein kondensierendes Enzym bei der Wachssynthese kodiert, die epidermisspezifische Expression eines  $\beta$ -Glucuronidase-Reportergens bewirken kann (Hooker et al. (2002), Significance of the expression of the CER6 condensing enzyme for cuticular wax production in Arabidopsis, Plant Physiol. 129(4), S. 1568-1580; Kunst et al. (2000), Expression of the wax-specific condensing enzyme CUT1  
15 in Arabidopsis, Biochem. Soc. Trans. 28(6), S. 651-654).

Jedoch ist es bisher nicht gelungen, geeignete epidermisspezifische Promotoren in monokotyledonen Pflanzen, die sich für die Expression von Transgenen in Monokotyledonen, insbesondere Poaceen (Süßgräsern), besonders gut eignen, zu  
20 identifizieren. Deshalb wurden bisher konstitutive Promotoren wie der Ubiquitin-Promotor aus Mais verwendet, um Proteine in der Epidermis zu exprimieren (siehe z. B. Oldach et al. (2001), Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat, Mol Plant Microbe Interact. 14(7), S. 832-838). Dies kann aber, wie oben beschrieben, zu unerwünschten Nebeneffekten bei  
25 den transgenen Pflanzen aufgrund der Anwesenheit des Transgenprodukts in anderen Geweben bzw. Organen als der Epidermis führen.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, Mittel bereitzustellen, die eine epidermisspezifische Genexpression in Monokotyledonen, bevorzugt in  
30 Getreidepflanzen, ermöglichen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungsformen.

- 5 Somit betrifft die vorliegende Erfindung eine Promotorregion mit Spezifität für die pflanzliche Epidermis, umfassend eine erste, aus dem Promotor des Gens Glutathion-S-Transferase A1 (GSTA1) stammende Sequenz, und eine zweite, aus dem Intron des Gens WIR1a stammende Sequenz. GSTA1 bezieht sich auf Gene, wie sie in Dudler et al. (1991), A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous  
10 to glutathione-S-transferases, Mol. Plant Microbe Interact. 4(1), S. 14-18 beschrieben sind. Insbesondere handelt es sich bei diesen Genen um Gene aus Weizen, es kann sich aber auch um homologe Gene aus anderen Getreidepflanzen, vor allem Gerste, mit vergleichbarem Expressionsmuster und ähnlichem Genprodukt handeln. WIR1a bezeichnet Gene, wie sie in Bull et al. (1992), Sequence and expression of a wheat  
15 gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense, Mol. Plant Microbe Interact. 5(6), S. 516-519, beschrieben sind.

Bevorzugt handelt es sich bei der ersten Sequenz um SEQ ID Nr. 1 und bei der zweiten Sequenz um SEQ ID Nr. 2.

20

Zwischen der ersten und der zweiten Sequenz können weitere, untranslatierte Sequenzen liegen, die eine Länge von 10bp bis 1000bp, bevorzugt von 20bp bis 800bp, besonders bevorzugt von 30bp bis 500bp und am meisten bevorzugt zwischen 40bp und 300bp aufweisen.

25

Besonders bevorzugt handelt es sich bei der erfindungsgemäßen Promotorregion um eine Promotorregion, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Promotorregionen, die die unter SEQ ID Nr. 3 angegebene Nukleinsäuresequenz umfassen;

- 5 -

- b) Promotorregionen, die einen funktionalen Teil der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz umfassen oder
- c) Promotorregionen, die eine Sequenz aufweisen, die unter stringenten Bedingungen

5 mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz hybridisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einer Promotorregion eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die die zur Expression einer kodierenden Sequenz (Transgen) notwendigen regulatorischen Sequenzen umfasst. Regulatorische Sequenzen bilden denjenigen Teil eines Gens, der die Expression einer kodierenden Sequenz bestimmt, also vor allem das Expressionsniveau und -muster. Die regulatorischen Sequenzen besitzen mindestens ein Sequenzmotiv, an das spezifische Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase binden, zum

10 Transkriptionskomplex assemblieren und die Transkription der von der Promotorregion kontrollierten Nukleinsäuresequenz wirksam initiieren.

Die erfindungsgemäßen Promotorregionen basieren auf der Beobachtung, dass durch Fusion des Promotors des GSTA1-Gens aus Weizen mit intronischen Sequenzen des WIR1a-Gens aus Weizen Promotoren mit neuen Eigenschaften hergestellt werden können.

20

In transienten Reporterassays in Weizenblättern mit einem  $\beta$ -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli* als Reporter gen wurden verschiedene Kombinationen des WIR1a-Promotors und -Introns und des GST-Promotors getestet. Es zeigte sich überraschenderweise, dass GST-Promotor und WIR1a-Intron einen synergistischen Effekt auf die Reporter-Gen-Aktivität ausüben. Die Steigerung der transkriptionellen Aktivität war vergleichbar mit der durch den ubiquitär exprimierten 35S-Promotor erzielten transkriptionellen Aktivität.

25



- 6 -

Unter dem Begriff „epidermisspezifisch“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden, dass eine unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion stehende Nukleinsäuresequenz in der Spross-epidermis von Pflanzen exprimiert wird. Insbesondere ist Epidermisspezifität im Sinne der vorliegenden Erfindung auch dann gegeben, wenn die erfindungsgemäße Promotorregion die Expression eines Fremdgens in der Epidermis im Vergleich zu anderen Zelltypen begünstigt und in der Epidermis eine signifikant, wie mindestens 2-fach, bevorzugt mindestens 5-fach und besonders bevorzugt mindestens 10- und am meisten bevorzugt 50-fach gegenüber anderen Zelltypen erhöhte Expression bewirkt. Die Expressionshöhe kann mit üblichen in situ-Nachweistechiken bestimmt werden.

Der Begriff „pflanzliche Epidermis“ ist dem Fachmann geläufig. Ergänzende Informationen sind in jedem Pflanzenanatomie- oder -physiologiebuch zu finden, wie etwa in Strasburger, Lehrbuch der Botanik, 35. Auflage 2002, Spektrum Akademischer Verlag.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass eine Promotorregion, die sowohl regulatorische Sequenzen aus dem GSTA1-Gen aus Weizen als auch Intron-Sequenzen aus dem WIR1a-Gen aus Weizen umfasst, eine epidermisspezifische Expression einer unter ihrer Kontrolle stehenden kodierenden Nukleinsäuresequenz bewirkt.

Neben einer Promotorregion, die die unter SEQ ID Nr. 3 dargestellten Nukleinsäuresequenzen aufweist, betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotorregionen, die die funktionalen Teile dieser Sequenz aufweisen und die in Pflanzen eine epidermisspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten kodierenden Nukleinsäuresequenz bewirken.

Unter einem „funktionalen Teil“ werden in diesem Zusammenhang Sequenzen verstanden, an die der Transkriptionskomplex trotz leicht abweichender

- 7 -

Nukleinsäuresequenz noch binden und epidermisspezifische Expression bewirken kann. Funktionale Teile einer Promotorsequenz umfassen auch solche Promotorvarianten, deren Promotoraktivität, verglichen mit dem Wildtyp, abgeschwächt oder verstärkt ist. Unter einem funktionalen Teil versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Varianten der in SEQ ID Nr. 3 angegebenen Sequenz der Promotorregion. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen und/oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Funktionale Teile der Promotorregionen umfassen im Rahmen der vorliegenden Erfindung natürlich vorkommende Varianten der SEQ ID Nr. 3 sowie künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhaltene Nukleotidsequenzen.

Der verwendete Promotor enthält in jedem Fall eine TATA-Box (Positionen 2163 bis 2169 in SEQ ID Nrn. 1 und 3) und bevorzugt auch zwei CAAT-Boxen (Positionen 1047 bis 1051 bzw. 1895 bis 1899 in SEQ ID Nrn. 1 und 3). Weiterhin ist mindestens eines, bevorzugt mindestens zwei und drei, besonders bevorzugt mindestens vier, fünf und sechs, und am meisten bevorzugt sieben und acht der folgenden Sequenzmotive im Promotor enthalten:

- a) GTGGGGG
- 20 b) ACGTGGA
- c) TCCACCT
- d) TATCCAT
- e) CATGCATG
- f) TGTAAG
- 25 g) CCTACCA
- h) AATAGTA

Bevorzugt liegen die Sequenzmotive an den Positionen, die den folgenden Positionen in SEQ ID Nrn. 1 und 3 entsprechen:

- 8 -

- a) 185-191 und 217-223bp
  - b) 455-461bp
  - c) 508-514bp
  - d) 564-570bp
  - 5     - e) 1514-1521bp
  - f) 1520-1526bp
  - g) 1569-1575bp
  - h) 1610-1616bp
- 10   Gemessen werden kann die Promotoraktivität von Varianten der Promotorregion mit Hilfe von Markergenen, deren kodierende Sequenz unter der Kontrolle der zu untersuchenden Promotorregion steht. Geeignete Markergene sind beispielsweise das  $\beta$ -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli*, ein Fluoreszenzgen wie etwa das Green-Fluorescence-Protein (GFP)-Gen aus *Aequoria victoria*, das Luziferase-Gen aus
- 15   *Photinus pyralis* oder das  $\beta$ -Galaktosidase-(lacZ)-Gen aus *E. coli*. Die absolute Promotoraktivität wird bestimmt durch Vergleich mit einer Wildtyp-Pflanze. Die Gewebe- bzw. Zellspezifität lässt sich leicht durch Vergleich der Expressionsraten der oben genannten Markergene in den jeweiligen Geweben bzw. Zellen bestimmen.
- 20   Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Promotorregionen mit einer Nukleinsäuresequenz, die mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Der Begriff „Hybridisierung unter stringenten Bedingungen“ bedeutet im Zusammenhang dieser Erfindung, dass die Hybridisierung *in vitro* unter Bedingungen durchgeführt wird,
- 25   die stringent genug sind, um eine spezifische Hybridisierung zu gewährleisten. Solche stringenten Hybridisierungsbedingungen sind dem Fachmann bekannt und können der Literatur entnommen werden (Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).



Allgemein bedeutet "spezifisch hybridisieren", dass ein Molekül unter stringenten Bedingungen präferenziell an eine bestimmte Nukleotidsequenz bindet, wenn diese Sequenz in einem komplexen Gemisch von (z. B. Gesamt-) DNA oder RNA vorliegt. Der Begriff „stringente Bedingungen“ steht allgemein für Bedingungen, unter denen  
5 eine Nukleinsäuresequenz präferenziell an ihre Zielsequenz hybridisieren wird, und zu einem deutlich geringeren Ausmaß oder gar nicht an andere Sequenzen. Stringente Bedingungen sind z. T. Sequenz-abhängig und werden unter verschiedenen Umständen unterschiedlich sein. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Im Allgemeinen werden stringente  
10 Bedingungen so ausgewählt, dass die Temperatur etwa 5°C unter dem thermischen Schmelzpunkt ( $T_m$ ) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH liegt. Die  $T_m$  ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH und Nukleinsäurekonzentration), bei der 50% der zu der Zielsequenz komplementären Moleküle zu der Zielsequenz im Gleichgewichtszustand  
15 hybridisieren. Typischerweise sind stringente Bedingungen solche, bei denen die Salzkonzentration mindestens ungefähr 0,01 bis 1,0 M Natriumionen-Konzentration (oder ein anderes Salz) bei einem pH zwischen 7,0 und 8,3 beträgt und die Temperatur mindestens 30 °C für kurze Moleküle (also z. B. 10-50 Nukleotide) beträgt. Zusätzlich können stringente Bedingungen durch Zugabe destabilisierender  
20 Agenzien, wie beispielsweise Formamid, erreicht werden.

Geeignete stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise auch beschrieben in Sambrook et al., vide supra. So kann die Hybridisierung etwa unter den folgenden Bedingungen stattfinden:

- 25 - Hybridisierungspuffer: 2x SSC, 10x Denhardt's Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1:1), 0,1% SDS, 5mM EDTA, 50mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 250µg/ml Heringssperma-DNA; 50µg/ml tRNA oder 0,25M Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 1mM EDTA, 7% SDS bei einer Hybridisierungstemperatur von 65°C bis 68°C

- 10 -

- Waschpuffer: 0,2x SSC, 0,1% SDS bei einer Waschtemperatur von 65°C bis 68°C

Vorzugsweise weisen derartige Promotorvarianten eine Sequenzidentität von  
5 mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90%  
und am meisten bevorzugt mindestens 95% zu der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen  
Promotorsequenz oder Teilen davon auf, bezogen auf die gesamte in SEQ ID Nr. 3  
gezeigte DNA-Sequenz. Vorzugsweise wird die Sequenzidentität derartiger  
Promotorsequenzen durch Vergleich mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen  
10 Nukleinsäuresequenz bestimmt. Wenn zwei unterschiedlich lange  
Nukleinsäuresequenzen miteinander verglichen werden, bezieht sich die  
Sequenzidentität vorzugsweise auf den prozentualen Anteil der Nukleotidreste der  
kürzeren Sequenz, die identisch sind mit den entsprechenden Nukleotidresten der  
längeren Sequenz.  
15 Sequenzidentitäten werden üblicherweise über verschiedene Alignment-Programme,  
wie z. B. CLUSTAL festgestellt. Allgemein stehen dem Fachmann zur Bestimmung  
der Sequenzidentität geeignete Algorithmen zur Verfügung, z. B. auch das  
Programm, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (z. B. der Link „Standard  
20 nucleotide-nucleotide BLAST [blastn]“) zugänglich ist.

Die oben für SEQ ID Nr. 3 angegebenen prozentualen Identitätsgrade gelten ebenso  
für die in SEQ ID Nrn. 1 und 2 gezeigten ersten und zweiten Sequenzen der  
erfindungsgemäßen Promotorregion.

25

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist die erfindungsgemäße  
Promotorregion die gesamte unter SEQ ID Nr. 3 angegebene Sequenz von 2552  
Nukleotiden auf.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch chimäre Gene aus der erfindungsgemäßen Promotorregion und einer kodierenden Sequenz, deren Expression, die natürlicherweise nicht durch die erfindungsgemäßen Promotorregion reguliert wird, im chimären Gen durch die erfindungsgemäße Promotorregion reguliert wird, in  
5 operativer Verknüpfung sowie rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die diese chimären Gene enthalten.

Der Begriff „Nukleinsäuresequenz, deren Expression durch die erfindungsgemäße Promotorregion reguliert wird“ bedeutet, dass die Expression der  
10 Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion in den Zellen, in denen die Promotorregion aktiv ist, um mindestens den Faktor fünf, bevorzugt mindestens den Faktor 10 und besonders bevorzugt mindestens den Faktor 50 gegenüber Wildtyp-Zellen gesteigert werden kann.

15 Bei der Nukleinsäuresequenz, deren Expression durch die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz reguliert wird, kann es sich um die kodierende Region eines Transgens handeln, z. B. eines Resistenzgens, dessen Genprodukt in der Epidermis erwünscht ist. Durch die Expression des Transgens kann der Gehalt des von ihm kodierten Genprodukts mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den  
20 Faktor 5, besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 10 und am meisten bevorzugt mindestens um den Faktor 50 erhöht werden.

Die erfindungsgemäße Promotorregion kann aber auch in RNAi-Konstrukten zur RNA-Interferenz eingesetzt werden, um das epidermisspezifische Silencing  
25 bestimmter Gene zu erreichen, deren Genprodukte in der Epidermis nicht oder in geringerem Ausmaß als üblich anwesend sein sollen. Letzteres kann natürlich auch mit klassischen antisense- oder Kosuppressionskonstrukten unter Einsatz der erfindungsgemäßen Promotorregionen erreicht werden. Die Expression des endogenen Gens wird durch die Silencing-Konstrukte um mindestens 50%,

bevorzugt um mindestens 70%, besonders bevorzugt um mindestens 90% und besonders bevorzugt um mindestens 95% verringert.

In einem Konstrukt, das zur RNA-Interferenz verwendet werden soll, liegen  
5 üblicherweise palindromische DNA-Sequenzen vor, die nach der Transkription doppelsträngige RNA bilden. Diese doppelsträngige RNA wird durch das Dicer-Enzym zu kürzeren RNA-Stücken prozessiert, die an eine endogene RNA binden und deren Abbau mit Hilfe des RISC (RNA-induced silencing complex) bewirken (Hannon (2002) RNA interference, Nature, Bd. 418, S. 244-251).

10 Der Effekt der Gen-Silencing-Konstrukte auf die Expression des endogenen Gens kann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden, die dem Fachmann wohl bekannt sind. So stehen zur Untersuchung des RNA-Levels Northern-Blot- und RT-PCR-Verfahren zur Verfügung, das Protein kann durch  
15 Western-Blot-Analysen, Immunfluoreszenzen oder, sofern es sich bei dem Protein um ein Enzym handelt, Enzymassays nachgewiesen werden.

Unter dem Begriff „Transgen“ werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung diejenigen Gene zusammengefasst, deren Genprodukte in der Epidermis  
20 bereitgestellt werden sollen, bzw. beim Gen-Silencing unterdrückt werden sollen.

Bei der Nukleinsäuresequenz, deren Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors steht, handelt es sich bevorzugt um eine Nukleinsäuresequenz, die Pathogenresistenz vermittelt, da die Epidermis die erste  
25 Barriere darstellt, die von einem Pathogen beim Eindringen in die Pflanze überwunden werden muss.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ ein Vektor verstanden, der ein erfindungsgemäßes chimäres  
30 Gen oder eine erfindungsgemäße Promotorregion enthält und die promotor-

- abhängige Expression der unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorregion stehenden Nukleinsäuresequenz in Pflanzenzellen und Pflanzen bewirken kann. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nukleinsäuremolekül zusätzlich transkriptionelle
- 5 Terminationssequenzen. Unter „transkriptionellen Terminationssequenzen“ werden dabei DNA-Sequenzen verstanden, die am Stromabwärts-Ende einer kodierenden Sequenz liegen und die RNA-Polymerase zum Stoppen der Transkription veranlassen.
- 10 Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit epidermisspezifischer Expression einer durch die erfindungsgemäße Promotorregion regulierten Nukleinsäuresequenz, umfassend die Schritte:
- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, in der die erfindungsgemäße Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer
  - 15 kodierenden Sequenz vorliegt,
  - b) Übertragung des Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
  - c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.
- 20 Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen bzw. deren Zellen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Das chimäre Gen kann an einer passenden
- 25 Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird dann für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert, und das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen
- 30 Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiolo-



gische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und daraus gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden.

- 5 Wie bereits erwähnt, stehen für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als
- 10 Transformationsmedium, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Einbringung von DNA mittels biolistischer Methoden sowie weitere Möglichkeiten, die bereits seit mehreren Jahren gut etabliert sind und zum üblichen Repertoire des Fachmanns in der pflanzlichen Molekularbiologie bzw. Pflanzenbiotechnologie
- 15 gehören. Die biolistische Gentransfermethode wird vor allem bei monokotyledonen Pflanzen verwendet. Hier findet der Fachmann nützliche Informationen zur Durchführung z.B. in Vasil et al. (1992) Bio/Technology, 10, S. 667-674; Vasil et al. (1993) Bio/Technology, 11, S. 1153-1158; Nehra et al. (1994) Plant J. 5, S. 285-297; Becker et al. (1994) Plant J., 5, S. 299-307; Altpeter et al. (1996) Plant Cell Reports
- 20 16, S. 12-17; Ortiz et al. (1996) Plant Cell Reports 15, S. 877-81; Rasco-Gaunt et al. (2001) J. Exp. Bot. 52; S. 865-874.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt

25 für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide, wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden.

Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens empfehlenswert. Dem Fachmann

sind die gängigen Selektionsmarker bekannt, und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen.

Je nach Einführungsmethode der gewünschten Gene in die Pflanzenzelle können  
5 weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Wird z.B. zur Transformation der  
Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muss mindestens die rechte  
Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- bzw. Ri-  
Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen  
verbunden werden. Werden zur Transformation Agrobakterien verwendet, muss die  
10 einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in  
einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren  
können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind,  
durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien  
integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA  
15 notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können allerdings nicht in  
Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre  
Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre  
Vektoren dagegen können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren.  
Sie enthalten ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker, welche von  
20 der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in  
die Agrobakterien transformiert werden. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium  
soll ein Plasmid enthalten, welches das chimäre Gen innerhalb der T-DNA trägt,  
welche in die Pflanzenzelle übertragen wird. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden  
sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von  
25 Pflanzenzellen verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von  
Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in allseits bekannten  
Übersichtsartikeln und Handbüchern zur Pflanzentransformation beschrieben  
worden. Für monokotyledone Pflanzen müssen für einen effektiven Agrobakterium-  
vermittelten Gentransfer abgewandelte Protokolle angewandt werden, wie sie etwa in  
30 Cheng et al. (1997) Plant Physiol. 115, S. 971-980; Khanna and Daggard (2003)

Plant Cell Reports 21, S. 429-436; Wu et al. (2003) Plant Cell Reports 21, S. 659-668; Hu et al. (2003) Plant Cell Reports 21, S. 1010-1019, beschrieben sind. Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonylharnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten. Hierzu sind auch alternative Marker geeignet, wie nutritive Marker oder Screeningmarker (wie GFP, green fluorescent protein). Selbstverständlich kann auch vollkommen auf Selektionsmarker verzichtet werden, was allerdings mit einem ziemlich hohen Screeningbedarf einhergeht. Falls markerfreie transgene Pflanzen erwünscht sind, stehen dem Fachmann auch Strategien zur Verfügung, die eine nachträgliche Entfernung des Markergens erlauben, z.B. Cotransformation oder Sequenz-spezifische Rekombinasen.

Die Regeneration der transgenen Pflanzen aus transgenen Pflanzenzellen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen können dann mittels üblicher Verfahren, einschließlich molekularbiologischer Methoden, wie PCR, Blot-Analysen, auf Anwesenheit und

Gewebespezifität der eingeführten Nukleinsäuresequenz, deren Expression von dem erfindungsgemäßen Promotor kontrolliert wird, bzw. der von ihr beeinflussten endogenen RNAs und Proteine untersucht werden.

- 5 Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, die eine durch die erfindungsgemäße Promotorregion regulierte Nukleinsäuresequenz enthalten und diese epidermisspezifisch exprimieren.

- Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen handelt es sich bevorzugt um
- 10 Monokotyledonen, insbesondere Getreidepflanzen wie Roggen, Mais und Hafer, besonders bevorzugt um Weizen oder Gerste, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze. Aber auch für andere Poaceen (Süßgräser) wie z. B. Futtergräser kann die
- 15 erfindungsgemäße Promotorregion zur Herstellung entsprechender Pflanzen mit epidermisspezifischer Expression von Transgenen eingesetzt werden.

- Unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen, epidermisspezifischen Promotors können Gene für die Produktion epikutikulärer Wachse exprimiert werden, um die
- 20 Trockenheitstoleranz der Pflanzen zu erhöhen. Außerdem können unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors Gene für die Produktion von Anthocyanen oder anderen UV-absorbierenden Substanzen zur Erhöhung der UV-Resistenz exprimiert werden. Wie oben bereits ausgeführt, werden bevorzugt Pathogen-Resistenzgene unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors exprimiert.

25

Als Pflanzenpathogene werden unter anderem Bakterien, Viren und Pilze bezeichnet, die Pflanzen infizieren und dadurch den Stoffwechsel der Pflanze negativ beeinflussen.

Zu diesen Pflanzenpathogenen gehören Pilze, die bei Getreidepflanzen wie Weizen und Gerste unter anderem die Krankheiten Echter Mehltau und Halmbruchkrankheit auslösen. Diese Krankheiten können abhängig von der Befallsstärke erhebliche Ertragsverluste (bis zu 50%) verursachen.

5

Traditionell werden die oben genannten sowie weitere pflanzliche Pilzerkrankungen durch den Einsatz von Fungiziden bekämpft, die die bekannten Nachteile, wie Grundwassergängigkeit und Akkumulation in der Nahrungskette, besitzen.

10 In den letzten Jahren wurden aber auch einige Gene identifiziert, die Resistenz gegen einen bestimmten oder gegen mehrere Erreger vermitteln können. Der Begriff „Vermittlung von Pathogenresistenz“, wie er hier verwendet wird, bedeutet, dass Pflanzen, in denen die Expression der besagten Gene erhöht ist, gegenüber Pflanzen, in denen die Expression der besagten Gene normal ist, weniger empfänglich für die  
15 Infektion mit bestimmten Pathogenen sind. Zu den Genen, die Pathogenabwehr vermitteln, gehören auch solche Gene, deren Expression durch Infektion mit einem Pathogen angeschaltet wird.

Zu diesen Genen gehören Peroxidasen und Oxalat-Oxidasen. Die Oxalat-Oxidasen, die zu der Familie der germinartigen Proteine gehören, katalysieren die Oxidation  
20 von Oxalat, wodurch Wasserstoffperoxid entsteht. Das Wasserstoffperoxid wirkt mikrobizid und kann die Lignifizierung der Zellwände fördern, wodurch das Eindringen von Schädlingen verhindert wird. Außerdem kann es in geringen Konzentrationen hypersensitiven Zelltod hervorrufen. Die Peroxidasen verwenden  
25 entweder molekularen Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid, um zelluläre Substrate zu oxidieren und dadurch zu entgiften.

Pathogene, gegenüber denen die Expression der Oxalat-Oxidasen und Peroxidasen in der Epidermis von Pflanzen Resistenz vermitteln kann, schließen zum Beispiel ein:  
30 Echter Mehltau, *Fusarium* spp., *Rhynchosporium secalis* und *Pyrenophora teres*.



Weitere Gene, die in der Lage sind, Resistenz gegen Pathogene zu vermitteln, sind Chitinasen, Ag-AFP, GSTA1 und WIR1a.

5 Durch die Expression der für diese Enzyme kodierenden Nukleinsäuresequenz in der Epidermis von transgenen Pflanzen mit Hilfe der erfindungsgemäßen Promotorregion können Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz erhalten werden.

10 Im Gegensatz zu den Pathogenresistenz vermittelnden Genen gibt es auch pflanzeneigene Gene, die das Eindringen eines Pathogens fördern. Zu diesen gehört das Mlo-Gen, das für einen Sieben-Transmembran-Rezeptor kodiert, der das Eindringen des Mehltau-Pilzes in die Epidermis zu fördern scheint. In diesem Fall ist es sinnvoll, mit der Expression des Mlo-Gens zu interferieren, um das Eindringen von Pilzen in die Pflanze zu verhindern. Dies kann z. B. mit Hilfe der oben beschriebenen RNAi-Methode erfolgen. Dass die Interferenz mit der Expression des Mlo-Gens geeignet ist, das Eindringen des Mehltaupilzes in die Pflanze zu verhindern, wurde in vitro an Blattsegmenten aus Gerste gezeigt, die mit Wolfram-Teilchen beschossen wurden, die mit Mlo-dsRNA beschichtet worden waren (Schweizer et al. (2000), Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals, The Plant Journal, 24 (6), S. 895-903). Jedoch konnte 15 bisher nicht gezeigt werden, dass die epidermis-spezifische Interferenz mit der Mlo-Expression in transgenen Pflanzen den gleichen Effekt hat.

Weitere pflanzliche Gene, die die Interaktion eines Pathogens mit der Pflanze vermitteln und dadurch das Eindringen des Pathogens in die Pflanze fördern können, 25 sind beispielsweise Aminosäuren- oder Zuckertransporter oder Invertasen. Diese Gene eignen sich ebenfalls als Angriffspunkte für das Gen-Silencing.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung pathogen-resistenter Pflanzen, umfassend die Schritte:

- 5
- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, in dem der erfindungsgemäße Promotor in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz, die Pathogenresistenz vermittelt, vorliegt,
  - b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
  - c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

10 Bevorzugt handelt es sich bei der Pathogenresistenz vermittelnden Nukleinsäuresequenz um die kodierende Region eines Peroxidase- oder Oxalat-Oxidase-Gens oder um eine Sequenz, die mit der endogenen Mlo-RNA interferiert.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung und sollten nicht einschränkend verstanden werden.

15

**Abbildungen:**

- 1) Nukleinsäuresequenz des GSTA1-Promotors (SEQ ID Nr. 1)
- 20 2) Nukleinsäuresequenz des WIR1a-Introns (SEQ ID Nr. 2)
- 3) Nukleinsäuresequenz der bevorzugten Promotorregion (SEQ ID Nr. 3)
- 4) Nukleinsäuresequenz der TAPERO (Peroxidase) cDNA (SEQ ID Nr. 4)
- 25 5) TAPERO-Expressionsvektor pPS41
  - a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 5)
  - b) Vektorkarte

- 21 -

6) Nukleinsäuresequenz der Germin 9f-2.8 (Oxalat-Oxidase) cDNA (SEQ ID Nr. 6)

7) Germin-Expressionsvektor pPS24

5 a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 7)

b) Vektorkarte

8) Sequenz des Mlo-RNAi-Konstrukts (SEQ ID Nr. 8)

10 9) Mlo-RNAi-Expressionsvektor pWIR5-TaMlo-RNAi

a) Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 9)

b) Vektorkarte

10) *In situ* Oxalatoxidase-Aktivität in pPS24-transgenen Pflanzen

15 Blätter von Bobwhite Wildtyppflanzen (BW) und von transgenen Linien Nr.157 und Nr. 170 wurden quergeschnitten und die Oxalatoxidase-Aktivität *in situ* nachgewiesen. Linke Spalte = Reaktion mit Oxalat-Substrat; rechte Spalte = Kontrollreaktion ohne Oxalat-Substrat. Die starke Violettfärbung zeigt Oxalatoxidase-Aktivität in der Epidermis der transgenen Linien an.

20

11) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen

a) im Northern Blot

Nachweis der Akkumulation von TAPERO RNA mittels Hybridisierung einer WIR3 Probe an Northern blots aus transgenen Weizenlinien der T2 Generation, die das pPS41 Konstrukt tragen. Es wurden je 2 Sublinien von 4 ausgewählten Linien plus Wildtyp (BW) im Adultpflanzenstadium analysiert. Blatt 1 = Fahnenblatt. Blätter 2-4 = zunehmend älter. Die TaGer-4 Sonde hybridisiert an eine Gruppe von stressinduzierten Weizengen und wurde verwendet, um pleiotrope Nebeneffekte der TAPERO-Überexpression zu testen. Keine signifikante Nebenwirkung wurde  
30 gefunden. EtBr = Beladungskontrolle der Gele, gefärbt mit Ethidiumbromid.

## b) im Western Blot

Nachweis der Akkumulation des TAPERO-Proteins mittels Antikörperreaktion auf Western Blots von transgenen Weizenlinien der T2 Generation, die das pPS41

- 5 Konstrukt tragen. Das TAPERO-Transgenprodukt hat die erwartete Grösse von 31 kD. In Bobwhite, Blatt 3 ist eine erhöhte Basalaktivität des TAPERO Gens zu beobachten. Blatt 1 = Fahnenblatt. Coomassie stain = Ladungskontrolle der Gele, gefärbt mit Coomassie Blau R250.

## 10 12) Nachweis der epidermisspezifischen Transgenexpression

## A) durch Northern Blot-Analyse

- Nachweis der Anhäufung von Oxalatoxidase- (links) und TaPERO (rechts)-mRNA in der Blattepidermis von transgenen Pflanzen, die das pPS24- bzw. das pPS41-Konstrukt tragen, mit spezifischen Sonden. W = RNA aus ganzem Blatt; E = RNA  
15 aus Blattepidermis. EtBr = Ethidiumbromid gefärbtes Gel als Ladungskontrolle; 26S RNA = Nachhybridisierung des Blots mit einer Sonde gegen die 26S ribosomale RNA als Ladungskontrolle.

## B) durch Real-time reverse PCR-Analyse

- 20 Es wurde die Konzentration der TaPERO mRNA in Gesamtblatt und Epidermis der transgenen Linie Nr. 2013 (transformiert mit dem Konstrukt pPS41) bestimmt. Die Daten wurden anhand der konstitutiv exprimierten Kontrollgene UBC (Ubiquitin konjugierendes Enzym) und GAPDH (Glyceraldehyd-Phospat Dehydrogenase) normalisiert. Die im Gesamtblatt verbleibende Expression stammt aus der nicht-  
25 abgezogenen oberen Blattepidermis und aus dem Phloem (Nebenaktivität des Promotors).

## C) durch Real-time reverse PCR-Analyse

- Es wurden Wildtyp-Pflanzen (Bobwhite) und die transgenen Linien Nr. 2013 und Nr.  
30 2151 (transformiert mit dem pPS 41-Konstrukt) im Adultpflanzenstadium analysiert.

Der Promotor wird vor allem in Blättern und Ähren stark exprimiert. In Stengel und Wurzeln wird das Transgen nicht oder nur schwach exprimiert.

13) Untersuchung der Mehltau-Resistenz von pPS41-transgenen Pflanzen

- 5 Das Fahnenblatt adulter Pflanzen wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Inokulationsexperimenten mit Pflanzen der T2 und T3 Generation. Sublinie 2088/2 exprimiert kein TAPERO und ist nicht erhöht resistent. Mittelwert
- 10 "non-silenced" = Mittelwert aus allen Linien außer 2088/2 und allen Experimenten.

14) Sprosswachstum von pPS41-transgenen Pflanzen

Pflanzen der T2 Generation wurden zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen ausgesät und im Adultpflanzenstadium fotografiert.

15

15) Untersuchung der Mehltau-Resistenz von pWIR5-TaMlo-RNAi-transgenen Pflanzen

- Das Fahnenblatt adulter Pflanzen der T2 Generation wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite
- 20 Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Je 2 Sublinien pro Linie wurden getestet.

**Beispiele:**

25

- In den nachfolgenden Beispielen wurden molekularbiologische Standardmethoden wie *E.coli* Transformation, Restriktionsverdau, Ligation, DNA Extraktion, PCR etc., wie sie im Stand der Technik bekannt sind, gemäss Sambrook et al. (2001), vide supra, durchgeführt. Für alle PCR-Reaktionen wurde „proofreading“ *Pwo*
- 30 Polymerase (Roche) verwendet.



1) Herstellung des Promotorkonstruktes aus GSTA1-Promotor und WIR1a-Intron  
(pPS18)

Die Herstellung erfolgte mehrstufig über folgende Vorläuferkonstrukte: pPS1, pPS3,  
5 pPS15. Alle Konstrukte enthielten das GUS Reportergen, um sie direkt im  
transienten Assay testen zu können.

pPS1:

Ein 1.9 kb Promotorfragment des WIR1a Gens wurde mit *Pst*I aus einem  
10 rekombinanten pBluescript Klon herausgeschnitten und in die *Pst*I-Schnittstelle einer  
Expressionskassette vor das GUS-Gen kloniert. Die Expressionskassette basierte auf  
pBluescript und enthielt das GUS-Gen gefolgt vom Transkriptionsterminator des  
Weizen GSTA1-Gens. Da das GUS-Gen und der GSTA1-Transkriptionsterminator  
in den verwendeten finalen Konstrukten (siehe Beispiel 2) nicht mehr enthalten sind,  
15 wird auf eine detaillierte Beschreibung dieser Expressionskassette verzichtet. Das  
resultierende Konstrukt enthielt eine translationelle WIR1a::GUS Fusion.

pPS3:

Mit den Adaptor-Primern 5' ATA TAT CTG CAG GGA GCC ACG GCC GTC  
20 CAC und 5' TAT CCC GGG CCC GTG CCT GGA CGG GAA wurde ein PCR  
Fragment von ca. 240 bp erzeugt und dessen Enden mit *Sma*I und *Pst*I geschnitten  
(auf Adaptor). Als PCR „template“ diente der genomische WIR1a Klon. Das PCR  
Fragment enthielt die letzten 15 Aminosäuren des ersten Exons von WIR1a und das  
Intron inklusive „splice site“ Akzeptor und wurde in pPS1, geschnitten mit *Pst*I  
25 (partiell) und *Sma*I und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, ligiert. Das  
resultierende Konstrukt enthielt eine translationelle WIR1a::GUS Fusion mit dem  
WIR1 Intron vor dem GUS Gen. Zudem wurde eine Deletion von Aminosäuren Nr.  
18-35 des ersten Exons von WIR1a eingeführt, um die Sekretion des WIR1a::GUS  
Fusionsproteins (durch Entfernen des Signalpeptids) zu verhindern.

- 25 -

pPS15:

Der WIR1a Promotor wurde durch ein PCR-Fragment des GSTA1-Promotors ersetzt. Zu diesem Zweck wurde pPS3 mit *XhoI* und *SnaBI* (partiell) verdaut und die Vektorbande über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Das GSTA1-

- 5 Promotorfragment von ca. 2.3 kb Länge wurde mit den Adaptor-Primern 5'ATA TAT CTC GAG TCT AGA ACT AGT GGA TCC und 5'ATA TAT TAC GTA GTT TGT CCG TGA ACT TCA aus dem genomischen GSTA1 Klon mittels PCR amplifiziert und an den Enden mit *XhoI* und *SnaBI* geschnitten. Das PCR Fragment wurde mit der geluierten pPS3 Bande ligiert, resultierend in einer translationellen
- 10 Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit GUS, unter der Kontrolle des GSTA1 Promotors.

pPS18:

- pPS15 wurde mit *PstI* und *SnaBI* (partiell) verdaut, die Vektorbande über Agarose-
- 15 Gelelektrophorese gereinigt und mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid (5'GTA CAC AGG CAG CTA GCT CTC GAA ACC TCG CTC GAA ACG CA plus 5'CAT GTG TCC GTC GAT CGA GAG CTT TGG AGC GAG CTT TGC GT) ligiert. Dies ersetzte den Teil des WIR1a Gens um den Translationsstart (46 bp upstream bis 53 bp downstream des Translationsstarts) mit 42 bp der 5'UTR des
- 20 WIR1a-Gens ohne das Translationsinitiationskodon ATG. Das resultierende Konstrukt enthielt eine transkriptionelle Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit GUS, unter der Kontrolle des GSTA1 Promotors.

## 2) Herstellung der verwendeten Konstrukte

- 25 a) Expressionsvektor pPS24 (Oxalat-Oxidase-Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

Ein *HindIII/SphI* Fragment von 745 bp Länge des Weizen gf-2.8 Gens (Oxalat-Oxidase; Acc. Nr. M63223) enthaltend den gesamten offenen Leserahmen (ORF) wurde in die pflanzliche Expressionskassette pGY1 subkloniert, was im Konstrukt

30 pGermin (beschrieben in Schweizer et al., 1999) resultierte. Für diese Klonierung

wurde das Oxalat-Oxidase-Fragment in einen Zwischenvektor ligiert, um das Fragment mittels der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pst*I in pGY1 ligieren zu können. Aus pGermin wurde ein *Sma*I/*Eco*RI Fragment von ca. 1 kb Länge, enthaltend das Oxalat-Oxidase-Gen und den CamV 35S Terminator, in den

5 *Sma*I/*Eco*RI-geschnittenen und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigten pPS18 Vektor ligiert. Das resultierende Konstrukt enthielt eine transkriptionelle Fusion des intronenthaltenden WIR1a Genfragmentes mit dem Oxalat-Oxidase-Gen unter der Kontrolle des GstA1-Promotors. Gegenüber pPS18 enthielt das Konstrukt nicht mehr den GstA1 Transkriptionsterminator, sondern denjenigen des CamV 35S Gens.

10

b) Expressionsvektor pPS41 (TAPERO-Expression unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

Aus pWIR3 (enthaltend eine transkriptionelle Fusion zwischen dem CamV 35S Promotor und TAPERO; Schweizer et al., 1999) wurde ein TAPERO-Fragment von

15 ca. 1.2 kb Länge durch Restriktionsverdau mit *Sma*I und *Pst*I isoliert. Das TAPERO-Fragment wurde in Vektor pPS24, der mit *Sma*I und *Pst*I (partiell) verdaut und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt wurde, ligiert. Dies resultierte in einer transkriptionellen Fusion des intronenthaltenden WIR1a-Genfragmentes mit dem TAPERO-Gen (Acc. Nr. X56011), unter der Kontrolle des GstA1-Promotors, in dem

20 das Oxalat-Oxidase Gen durch das TAPERO-Gen ausgetauscht wurde. Wie pPS24 enthält pPS41 den Transkriptionsterminator des CamV 35S Gens.

c) Expressionsvektor pWIR5-TaMlo-RNAi (Expression des Mlo-RNAi-Konstrukts unter der Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors)

25 Zunächst wurde das im Vektor pGEM-Teasy subklonierte 3. Intron des *Mla*I Resistenzgens aus Gerste (ca. 1.1 kb) mittels *Eco*RI und *Pst*I isoliert und in den ebenfalls *Eco*RI und *Pst*I geschnittenen Vektor pBSw41 (pBluescript-Derivat mit partieller *TaMlo*I cDNA, kloniert von Candace Elliott im Rahmen ihrer Dissertation; GenBank accession no. AF361933) ligiert. Aus diesem Konstrukt wurde das *Mla*I

30 Intron zusammen mit einem Teil der codierenden Sequenz des *TaMlo*I-Gens als ca.

1.55 kb *PstI/MscI*-Fragment isoliert (= Fragment 1). Parallel hierzu wurde per PCR aus dem Plasmid pBSw41 mit den Oligonukleotiden T3 (Standard-Sequenzier-Primer für pBluescript) und TaMlo1-1 (5' GTC GCA TGC CTG TCC ACA CGA AAT GTG C 3', *SphI* Restriktionsschnittstelle unterstrichen) ein ca. 450 bp großes  
5 Fragment amplifiziert. Nachfolgend wurde das PCR-Fragment mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *SphI* verdaut (= Fragment 2). Der Vektor pPS24 (Promotor + Oxalat-Oxidase, siehe oben) wurde mittels Restriktionsverdau mit *SmaI* und *SphI* geöffnet und das herausgeschnittene Oxalat-Oxidase-Genfragment verworfen. In einer Drei-Komponenten-Ligation wurden sodann die oben  
10 beschriebenen Fragmente 1 und 2 in den *SmaI/SphI* geschnittenen Vektor pPS24 ligiert. Bei dieser Ligation sind die Enden der *MscI* und *SmaI* geschnittenen Komponenten kompatibel, da es sich bei beiden um sogenannte „stumpfe Enden“ (blunt ends) handelt. Das resultierende Konstrukt (pTaMlo1 RNAi) enthält ca. 300 bp des *TaMlo1*-Gens sowie ca. 150 bp Polylinker/Adaptor-Sequenz als „inverted  
15 repeats“, separiert durch das *MlaI*-Intron. Die Kontrolle dieser Transkriptionseinheit unterliegt dem GstA1 Promotor.

Anmerkung: Das hier aus historischen Gründen als *TaMlo1* bezeichnete Gen erhielt später die Bezeichnung *TaMloA1* (Elliott *et al.*, 2002). Mol. Plant Microbe Interact. 15: 1069-1077 (2002).

20

### 3) Transformation der Weizenpflanzen

Weizenpflanzen (cv. Bobwhite) wurden in Phytokammern für 40 Tage bei 15°C tagsüber und 12°C nachts unter Kurztagbedingungen (10h/d, ca. 600 µE) und nachfolgend im Gewächshaus bei 18/16°C und einer Photoperiode von mindestens  
25 16 h angezogen. Die Ähren wurden entweder unmittelbar verwendet oder bis zu 5 Tage bei 4°C aufbewahrt. Die von der Ähre abgenommenen Karyopsen wurden für 2 Minuten mit 70% Ethanol und dann für 15 bis 20 Minuten in 5% Natriumhypochlorit-Lösung/ 0,1% Tween 20 oberflächensterilisiert und schließlich viermal mit sterilem Aqua bidest gewaschen.

30

Unreife Embryonen mit einer Größe von 0,5 bis 1,5 mm wurden unter sterilen Bedingungen aus den Karyopsen herauspräpariert und mit dem Scutellum nach oben auf Kallusinduktions-Medium in Petrischalen aufgelegt (Basismedium nach Murashige Skoog (1962) mit 2 mg/l 2,4-D, 40 g Maltose-Monohydrat, 500 mg/l L-Glutamin, 100 mg/l Caseinhydrolysat, 5 µM CuSO<sub>4</sub> und 0,25% Phytigel). Die Kulturen wurden bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

Fünf bis sieben Tage nach Isolierung der Embryonen erfolgte die biolistische Transformation. Vier bis sechs Stunden vor dem Partikelbeschuss wurden die bereits proliferierenden Embryonen auf neues Medium mit verringertem Wasserpotenzial übertragen (wie oben, supplementiert mit 0,3 M Mannitol) und bei 25°C im Dunkeln inkubiert.

Das Plasmid pAHC20 (Christensen and Quail 1996), das das Phosphinothricinacetyltransferase-codierende *bar*-Gen enthält, wurde in einem molaren Verhältnis von 1:1 mit einem zu co-transformierenden Vektor gemischt. Insgesamt wurden dann 10 µl Plasmid-DNA-Lösung auf die Partikel von 25 µl einer 60 mg/l Goldsuspension präzipitiert. Für einen Beschuss wurden 30 µg Partikel in 5 µl Ethanol auf einen Makrocarrier aufgetragen. Der Beschuss erfolgte entsprechend den Herstellerangaben der DuPont PDS-1000/He.

Zwölf bis 16 Stunden nach dem Partikelbeschuss wurden die Explantate auf neues Kallusinduktions-Medium (wie für die Vorkultur der Embryonen) übertragen und 10 Tage bei 25°C im dunkeln inkubiert.

Die Kalli wurden danach auf Differenzierungsmedium übertragen (Basismedium nach Murashige and Skoog (1962) mit 20 g/l Saccharose, 5 µM CuSO<sub>4</sub>, 0,25% Phytigel und 3 mg/l Bialaphos) und bei einer Photoperiode von 16h bei 200 µE und 25°C inkubiert.



- 29 -

Nach 2 Wochen erfolgte die Übertragung der nicht verbräunten Kalli auf Regenerationsmedium (Basismedium nach Murashige and Skoog (1962) mit 20 g/l Saccharose, 0,25% Phytigel und 4 mg/l Bialaphos) und eine weitere Inkubation bei einer Photoperiode von 16h bei 200  $\mu$ E und 25°C.

5

Nach weiteren 2 Wochen wurden die entstandenen Sprosse vereinzelt, in Kulturröhrchen mit Regenerationsmedium übertragen und bei einer Photoperiode von 16h bei 200- $\mu$ E und 25°C weiterkultiviert.

10 Die Identifizierung transgener Regenerate erfolgte per PAT-Aktivitätstest von Blattextrakten nach Spencer et al. (1990) bzw. durch Amplifizierung Transgen-spezifischer Sequenzen aus genomischer DNA der Kandidatenpflänzchen und/oder Southern Blot unter Verwendung einer entsprechenden Sonde.

15 Die Transformationseffizienz der Methode lag in Abhängigkeit von der Qualität des Ausgangsmaterials zwischen 0,5 bis 3 transgenen Pflanzen pro 100 kultivierten Embryonen.

4) *In situ* Oxalat-Oxidase-Aktivität in Pflanzen mit dem pPS24-Konstrukt  
20 Blattsegmente von Bobwhite Wildtyppflanzen oder von pPS24-transgenen Weizenpflanzen der T3 Generation wurden unter Vakuum mit Oxalat-Oxidase-Nachweislösung (2.5 mM Oxalsäure, 3.5 mM freies EDTA, 0.6 mg/ml 4-Chlor-1-Naphthol, 50  $\mu$ g/ml Peroxidase aus Meeretich, 20% v/v Ethanol, mit Tris Base auf pH 4.0 eingestellt) infiltriert und über Nacht bei +37°C inkubiert. Nach Entfernen  
25 der Nachweislösung wurden die Blätter für weitere 24 h bei +4°C in H<sub>2</sub>O inkubiert. Danach wurden die Blätter von Hand mittels Skalpell in dünne Segmente quergeschnitten und mikroskopiert. Die Phasenkontrast-Lichtmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axiophot bei 100-facher Vergrößerung. Zellen mit Oxalat Oxidase Expression besitzen violett gefärbte Zellwände.

30

5) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen durch Northern-Blot-Analyse

Blätter von Bobwhite und von pPS41-transgenen Pflanzen der T2 Generation (je ca. 1 g Frischgewicht, FG), beide im Fahnenblattstadium, wurden in flüssigen Stickstoff homogenisiert, bis feines Pulver entstand. Das Pulver wurde zu 3 ml RNA-Extraktionspuffer (0.5 M Tris-Cl pH 8.0; 0.25 M Na-EDTA; 5% (w/v) SDS) und 1,5 ml puffergesättigtem Phenol gegeben (15 ml Plastik-Röhrchen) und gut geschüttelt. Die Extrakte wurden für 30 min bei 4000 rpm-5000 rpm, 20°C zentifugiert (swing out, Heraeus Varifuge). Es wurde 1,5 ml Chloroform zugegeben (ohne Überstand abzugießen) und das Röhrchen mehrere Male invertiert. Die Extrakte wurden für 30 min bei 4000 rpm-5000 rpm, 20°C rezentifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Röhrchen (15 ml Plastik-Röhrchen) gegossen. Die RNA wurde durch Zugabe von 3 ml 6 M LiCl gefällt (über Nacht, 4°C). Die gefällte RNA wurde für 30 min bei 12500 rpm, 4°C zentifugiert (Festrotor, Hermle Z360K), die RNA-Pellets wurden in 500-1000 µl 70% Ethanol aufgenommen (RNA löst sich nicht) und in Eppendorf röhrchen überführt. Die Proben wurden für 10 min bei 14000 rpm, 4°C zentrifugiert (Festrotor, Eppendorf Centrifuge 5417R) und der Überstand abgehoben. Die RNA-Pellets wurden 5 min bei 37°C getrocknet, in 100 µl-200 µl TE aufgenommen und 5-10 min bei 75°C gelöst. Die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese der RNA in formaldehydhaltigen Gelen und der Transfer auf Nylonmembranen (Hybond N, Amersham) erfolgte gemäss Standardprotokollen (Sambrook et al., vide supra). Pro Probe wurden 10-µg RNA aufgetragen.

Die radioaktive Sondenmarkierung mit  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ -dCTP erfolgte nach der Methode des „random prime labelling“ unter Verwendung eines Kits (Roche). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in CHURCH Puffer (0,5 M NaPhosphat pH 7,2; 1 % (w/v) BSA; 7 % (w/v) SDS; 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA). Die Blots wurden 2 x 15 min in Waschlösung (0.1 x SSC; 0.1 % w/v SDS) bei 65°C gewaschen und anschließend für 16-48 h gegen Phosphorimager-Screens exponiert. Die exponierten Screens wurden mit einem Phosphorimagergerät (FujiFilm FLA 3000) eingescannt und als Bilddateien im TIFF Format exportiert.

6) Nachweis des TAPERO-Transgens in pPS41-transgenen Pflanzen durch Western-Blot-Analyse

Blattspitzen von Bobwhite und von pPS41-transgenen Pflanzen der T2 Generation, beide im Fahnenblattstadium, wurden in IWF Puffer (32 mM Na-Phosphat; 84 mM Citrat; pH 2.8; Spatelspitze Polyvinylpolypyrrolidon) homogenisiert. Die Homogenate wurden für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 0.5 g/ml Ammoniumacetat versetzt und säurelösliche Proteine über Nacht bei 4°C gefällt. Die Proteine wurden für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proteinpellets wurden in 50 µl/g FG Resuspensionspuffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5; 20 % (v/v) Glycerin) aufgenommen. Zu 20 µl Probe wurden 5 µl 4-fach konzentrierter SDS Probenpuffer zugegeben, und die Proben wurden mit soviel (1-5 µl) gesättigter Tris-Lösung versetzt, bis der Farbumschlag des Bromphenolblaus zu Blau stattfand. Pro Spur wurden 12,5 µl gekochte Probe in denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (15%iges Trenngel) nach einer Standardmethode unter Verwendung von Minigelapparaturen der Firma Bio-Rad aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder Coomassie gefärbt (als Beladungskontrolle) oder nach einer Standardmethode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (geblottet). Die Membranen wurden nach einer Standardmethode mit einem ersten, polyklonalen Antikörper (Verdünnung 1:2000), gerichtet gegen das Prx8 Protein aus Gerste (ein homologes Protein zu TAPERO), inkubiert, gefolgt vom zweiten Antikörper (Verdünnung 1:2000), der gegen Kaninchen-Antikörper gerichtet und an den alkalische Phosphatase gekoppelt war. Die TAPERO Proteinbanden wurden durch lokalisierte alkalische Phosphataseaktivität (BCIP/NBT Färbelösungen; Fertigtabletten (Roche)) nachgewiesen.

7) Nachweis der epidermisspezifischen Transgenexpression durch Northern-Blot-Analyse und Real-Time-PCR-Analyse

Die RNA-Extraktion und die Northern-Blot-Analyse wurden durchgeführt wie in Beispiel 5 beschrieben. Die Real-Time-PCR-Analyse erfolgte mit einem LightCycler®-Gerät (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben.

5

8) Mehltäuresistenz in pPS41- bzw. pWIR5-TaMlo-RNAi-transgenen Pflanzen

Für den Resistenztest wurden adulte, im Gewächshaus angezogene pPS41- oder

pWIR5-TaMlo-RNAi-transgene Weizenpflanzen mit voll entwickeltem, frisch

geschobenem Fahnenblatt verwendet. Als Kontrollen dienten gleichzeitig

10 

angezogene Wildtyp-Pflanzen

cv. Bobwhite. Die apikale Hälfte des Fahnenblattes wurde abgeschnitten und auf 0,5% (w/v) Phytoagar, der mit 20 ppm Benzimidazol versetzt war, in 20 x 20 cm großen Polycarbonat-Schalen aufgelegt. Pro Schale wurde eine transgene Sublinie (je 20 Blätter) plus Bobwhite Wildtyp (je 6 Blätter) aufgelegt. Die Blattsegmente

15 

wurden in einem Inokulationsturm mit Mehltausporen inokuliert, indem Sporen von 4 stark inokulierten Weizenblättern in den Turm eingeblasen wurden. Nach 5 min wurden die Schalen entfernt, geschlossen und bei 20°C und indirektem Tageslicht inkubiert. Sieben Tage nach Inokulation wurde der Mehltaubefall bonitiert unter Verwendung eines Klassenbonitursystems (Schweizer et al., 1995). Die Resistenz

20 

wurde bezogen auf die sich auf der jeweiligen Phytoagarplatte befindlichen

Kontrollblätter berechnet.

**Literatur:**

- Christensen and Quail (1996) Transgenic Res. 5: 213-218.
- 5 Elliott *et al.*, (2002). Molecular Plant Microbe Interactions 15: 1069-1077.
- Murashige and Skoog (1962) Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- 10 Schweizer, P., Vallélian-Bindschedler, L., and Mössinger, E. (1995). Heat-induced resistance in barley to the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, Physiological and Molecular Plant Pathology 47, 51-66.
- 15 Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O., and Dudler, R. (1999). A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat, Mol Plant-Microbe Interact 12, 647-654.
- Spencer et al. (1990) TAG 79: 625-631.



## A N S P R Ü C H E

1. Promotorregion mit Spezifität für die pflanzliche Epidermis,  
5 umfassend eine erste, aus dem Promotor des Gens GSTA1 stammende Sequenz, und  
eine zweite, aus dem Intron des Gens WIR1a stammende Sequenz.
2. Promotorregion nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei der ersten Sequenz um SEQ ID Nr. 1 und  
10 bei der zweiten Sequenz um SEQ ID Nr. 2 handelt.
3. Promotorregion nach Anspruch 1 oder 2,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass sie ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
- 15 a) Promotorregionen, die die unter SEQ ID Nr. 3 angegebene  
Nukleinsäuresequenz umfassen,  
b) Promotorregionen, die einen funktionalen Teil der unter SEQ ID Nr. 3  
angegebenen Nukleinsäuresequenz umfassen, und  
c) Promotorregionen, die eine Sequenz aufweisen, die unter stringenten  
20 Bedingungen mit der unter SEQ ID Nr. 3 angegebenen  
Nukleinsäuresequenz hybridisiert.
4. Chimäres Gen,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass es eine Promotorregion nach einem der Ansprüche 1  
bis 3 in operativer Verknüpfung mit einer kodierenden Sequenz enthält.  
25
5. Chimäres Gen nach Anspruch 4,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass seine Expression zu einem erhöhten Gehalt des von  
der kodierenden Sequenz kodierten Proteins in der Epidermis führt.

- 35 -

6. Chimäres Gen nach Anspruch 4 oder 5,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die kodierende Sequenz aus einem Resistenzgen stammt.
- 5 7. Chimäres Gen oder rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5 oder 6,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die kodierende Sequenz für eine Peroxidase oder eine Oxalat-Oxidase-kodiert.
- 10 8. Chimäres Gen nach Anspruch 4,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass seine Expression die Expression des entsprechenden endogenen Gens in der Epidermis unterdrückt.
- 15 9. Chimäres Gen nach Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die kodierende Sequenz in antisense-Orientierung vorliegt.
- 20 10. Chimäres Gen nach Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die Unterdrückung der Expression des endogenen Gens durch RNA-Interferenz erfolgt.
- 25 11. Chimäres Gen nach einem der Ansprüche 8 bis 10,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass das endogene Gen, dessen Expression unterdrückt wird, das Mlo-Gen ist.
12. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Promotorregion nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein chimäres Gen nach einem der Ansprüche 4 bis 11.

- 36 -

13. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 12, zusätzlich umfassend transkriptionelle Terminationssequenzen.

14. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen mit  
5 epidermisspezifischer Expression eines Transgens, umfassend die Schritte:
- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 12 oder 13,
  - b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
  - 10 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen

15. Transgene Pflanzen, enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 12 oder 13 oder hergestellt nach einem  
15 Verfahren nach Anspruch 14, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze.

16. Transgene Pflanzen nach Anspruch 15, bei denen es sich um  
20 monokotyledone Pflanzen handelt.

17. Transgene Pflanzen nach Anspruch 16, bei denen es sich um Poaceen handelt.

25 18. Transgene Pflanzen nach Anspruch 17, bei denen es sich um Weizen oder Gerste handelt.

19. Verwendung einer Promotorregion nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur epidermisspezifischen Expression von Transgenen in Pflanzen.

- 37 -

20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei das Transgen ein Resistenzgen ist.

5 21. Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz in transgenen Pflanzen, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 12 oder 13,
- b) Übertragung des rekombinanten Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen und
- 10 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

22. Transgene Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz, enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder  
15 hergestellt nach einem Verfahren nach Anspruch 21, sowie transgene Teile dieser Pflanzen und deren transgenes Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanze.

20 23. Transgene Pflanzen nach Anspruch 22, bei denen es sich um monokotyledone Pflanzen handelt.

24. Transgene Pflanzen nach Anspruch 23, bei denen es sich um Poaceen handelt.

25

25. Transgene Pflanzen nach Anspruch 24, bei denen es sich um Weizen oder Gerste handelt.

26. Transgene Pflanzen nach einem der Ansprüche 22 bis 25,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass sie eine erhöhte Resistenz gegen Echten Mehltau  
zeigen.



GACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCAGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGAC  
TGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGCGGGTGTGGGGCAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCC  
TCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTGGGGGTGCGCCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGGTGCGCCGGCTGGCGTTCT  
GCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGCGTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTG  
GCGAAGAGATCCGAGTCCTGGGGAGATCAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGG  
GCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGGCTGCTAGCTAGGGAAGTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGC  
TAAGTACTTTAACTTTTCCTTCTCACATCCACCTGATTAGATTATTTTGATCTAAATTAAGTTGCAAAAAATATATGTG  
TGATATCCATCTACTATAATTGCTTACAATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTTATATGCACAGTAA  
ATCTGAATGTTCTTACATGCATGATTTAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAACTAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGG  
AGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTTTGCCCTACGGAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTA  
GGATAAACGTAAAACCTTCTCGATGTATCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACT  
TTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATTCCACACTCTAGCCAAACGAAGTATTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAG  
CCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCTATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTG  
TCGCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGCGATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGC  
AAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCAAGCTTAACTCTCGGAAGTTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAA  
AAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAAAATATTCAATTGAGTGACAACGAAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGT  
TGATTTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTACCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCACCCTTAGTGTTTTCGAGACA  
ACGAGAGGGCACATTGCTTTTTGGTGCTACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCG  
TTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTAGCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACGCCGATAGCCGCCATGCAT  
GTAAAGTCTTTTTACCTTTACACTTGCTCAAGTGACACTGTATGTCGCCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGC  
TAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATTTACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTG  
ACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTTCTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAG  
GGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAATTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCTTACCCGATGTTTGGGGGGC  
TGTCGGAAATTGGTTCCGCGATCTACAAAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTT  
CTAACTAGTACTTACTTCCCTTCGCACCACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCC  
GGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTAATTTGGCACTCATCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAG  
ATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATGTAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCT  
GTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAGGCCTCCTCCCA

**Abbildung 2:****WIR1A Intron:**

GTCAGTCGTCGGACGGTGTCCGTTTCCTCCCCATTTTGTAATTGATTAAGTTGTTATACATGCTGACCTCGACCTGCT  
GAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACC

## Abbildung 3:

GstA1 Promotor mit WIRla Exon/Intron:

GACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCAGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGAC  
TGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGCGGGTGTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCC  
TCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTGGGGGTGCGCCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGGTGCGCCGGCTGGCGTTCT  
GCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGCGTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTG  
GCCAAGAGATCCGAGTCCTGGGGAGATCAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGG  
GCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGGCTGCTAGCTAGGGAACGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGC  
TAAGTACTTTAACTTTCCTTCTCACATCCACCTGATTCAGATTATTTTGATCTAAATTAACCTGCAAAAAATATATGTG  
TGATATCCATCTACTATAATTGCTTACAATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTTATATGCACAGTAA  
ATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATTTAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAACTAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGG  
AGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTTTGCCTACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTA  
GGATAAACGTAAAACCTTCTCGATGTATCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACT  
TTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATTCCACACTCTAGCCAAACGAACTATTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAG  
CCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCTATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTG  
TCGCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGCGATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGC  
AAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCAAGCTTAACTCTCGGAACCTTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAA  
AAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAAAATTATTCAATTGAGTGACAACGAAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGT  
TGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTACCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTTCGAGACA  
ACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCTACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCGCG  
TTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTAGCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTCGGCAGCCGGATAGCCGCCATGCAT  
GTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTGCTCAAGTGACACTGTATGTCGCCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGC  
TAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATTTACAGTGTTTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTG  
ACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTTCTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAG  
GGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAATTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCCTTACCGATGTTTGGGGGGC  
TGTCGGAAATTGGTTCCGCGATCTACAAAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTT  
CTAACTAGTACTTACTTCCCTTCGCACCACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCC  
GGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTAATTTGGCACTCATATTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAG  
ATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATGTAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCT  
GTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAGGCCTCCTCCCACACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTAT  
CTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGCATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCG  
AAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGATCGCTCTCTTCGTCGTCGTCGCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCTT  
GGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCCGCTCAGGTGAGTCGTCGACGGTGTCCGTTTCAATTCCTCCCCATTTTTGTAA  
TTGATTAACCTGTTATACATGCTGACCTCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACC

## Abbildung 4:

TAPERO cDNA:

ACCACCACACCACTCCACCAGTAAGAAGTGCAGCAGGTAGCTAGTAAGCCGGCGTAGCTTTGCTCTTGCAGCTAGCTAGC  
TAACCATGGCCGCCTCTGCCTCTTGCCTTTCTCTTGTGGTGCTCGTGGCTCTGGCCACGGCGGCGTCCGGCGCAGCTGTCA  
CCGACCTTCTACGACACGTCCTGCCCCAGGGCCCTGGCCATCATCAAGAGTGGCGTCATGGCCGCCGTGAGCAGCGACCC  
TCGGATGGGCGCGTCTGCTCCGGCTGCACTTCCACGACTGCTTCGTCCAAGGCTGCGACGCGTCTGTTTTGCTGTCTG  
GCATGGAACAAAATGCTATCCCGAACGCGGGGTCGCTGAGGGGCTTCGGCGTCATCGACAGCATCAAGACGCAGATCGAG  
GCCATCTGCAATCAGACCGTCTCCTGCGCCGACATCCTCACCCTCGCCGCCCGTGACTCCGTTGTAGCCCTCGGAGGGCC  
GTCATGGACAGTCCCTCTGGGGAGAAGAGATTCCACAGATGCAAACGAGGCGGCGGCAAACAGCGACCTGCCAGGCTTTA  
CATCTAGCCGGTCAGATCTTGAGCTGGCATTTCAGAAACAAGGGCCTCCTTACGATCGACATGGTGGCCCTCTCGGGCGCG  
CACACCATCGGCCAGGCGCAGTGTGGGACCTTTAAGGACAGGATCTACAATGAGACTAACATCGACACGGCCTTCGCCAC  
ATCTCTCCGGGCCAACTGCCCCAGGTCAAACGGCGACGGGAGCCTGGCGAACCTGGACACGACGACGGCCAACACGTTG  
ATAACGCCTACTACACCAACCTCATGTACAGAAGGGGCTCCTGCACTCGGACCAGGTGCTGTTCAACAACGACACCACC  
GACAACACTGTCCGGAACCTTTCGCTCGAACCAGCGGCGTTCAGCAGCGCCTTCACGACCGCCATGATCAAGATGGGCAA  
CATCGCGCCGAAGACAGGCACGCAGGGGCAGATCAGGCTCAGCTGCTCCAGGGTGAACCTCGTGATTGATAGACGAGTTAC  
TGCATACTAGCCAGCACGACACGTACGTGAATGAATAAGGCCACAGAACCAGTGGCCAATATAAATACCAGCTCTTGAAA  
CCGTGTATTTTATGTACGAGTAGCAGCAAATCATGCATGCATCTACACATATATATGTAACGATCGAATTCCCACCTTCT  
CATGCAAAGGCATGGAGAATTACTATCAATCTTAGTTATACGTGTA

## Abbildung 5a:

## Eigenschaften von pPS41:

Gesamtlänge:	7011 bp
vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI Schnittstellen.	
GstA1 Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstA1 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
TAPERO cDNA	3264-4509
ATG TAPERO	3348
Stop codon:	4284
Poly(A)	4510-4514
CamV 35S Terminator:	4576-4776

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCG  
AAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCA  
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC  
CTAATCAAGTTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGAC  
GGGGAAGCCGCGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG  
GTCACGCTGCGCGTAACCACACACCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCATTCAGGCTGCG  
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT  
TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTA  
TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGTCTAGAACTAGTGGATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCC  
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGACTGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGC  
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCTCACCGCGATCTGCTCCTTCTGGGTG  
GGGTGCGCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGTTCGCCGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGC  
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGATCCGAGTCTGGGGAGAT  
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGCGGTGATCAACGAGGTGCTAGG  
CTGCTAGCTAGGGAAGTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAACTTTCTTCTCACA  
TCCACCTGATTAGATTATTTTGATCTAAATTAAGTTCGAAAAATATATGTGTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC  
AATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTAGAAGATTTATATGCACAGTAAATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATT  
TAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGGAGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTT  
TGCCTACGGAAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTAGGATAAACGTAAACCTTCTCGATGTA  
TCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACTTTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATT  
CCACACTCTAGCCAAACGAACATTTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAGCCAGAGCCGTTGGAAAGTCTGTCTTGCT  
ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTGTCGCCCTACCAATGGGCCAACTGCTAGC  
GATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCA  
AGCTTAACTCTCGGAACCTTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAGATTAAAAAAAATACATTTCCATCGATAGTGA  
AATTATTCAATTGAGTGACAACGAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGTGATTTTAAATTAGAGGCATTTTCTA  
CCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTCGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCT  
ACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCGCGTTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTA  
GCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTCGGCAGCCGATAGCCGCCATGCATGTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTG  
CTCAAGTGACACTGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT  
TACAGTGTCTTGTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCAATTTTAGACTAGCTGACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTT  
CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAA  
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCCTCACCGATGTTTGGGGGGCTGTCGGAAATTGGTTCCGCGATCTACA  
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTTCTAACTAGTACTTACTTCCCTTCGCACC  
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAGATGATTACTTACCCGGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTA  
ATTTGGCACTCATCATTTTATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATG  
TAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG  
GCCTCCTCCCACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGC  
ATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCGAAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGA  
TCGCTCTCTTCGTCGTCGTCGCCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCTTGGAGCCACGGCCGTCACGACGCGGCC  
GCCTCAGGTCAGTCGTCGGACGGTGTCCGTTCAATTTCTCCCATTTTTGTAATTGATTAACTTGTATACATGCTGACC  
TCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACCCCGGGCTGCAGGAATTACACCACACACCACTCCA  
CCAGTAAGAAGTGCAGCAGGTAGCTAGTAAGCCGGCGTAGCTTTGCTCTTGCAGCTAGCTAGCTAACCATGGCCGCCTCT  
GCCTCTTGCTTTCTCTTGTGGTGCTCGTGGCTCTGGCCACGGCGCGTGGCGCAGCTGTACCGACCTTCTACGACAC  
GTCTGCCCCAGGGCCCTGGCCATCATCAAGAGTGGCGTCATGGCCGCCGTGAGCAGCGACCTCGGATGGGCGCGTCGC  
TGCTCCGGCTGCACTTCCACGACTGCTTCGTCCAAGGCTGCGACGCGTCTGTTTGTCTGTCTGGCATGGAACAAATGCT  
ATCCCGAACGCGGGGTGCTGAGGGGCTTCGGCGTCATCGACAGCATCAAGACGCAGATCGAGGCCATCTGCAATCAGAC  
CGTCTCCTGCGCCGACATCCTACCGTCCGCGCCCGTGACTCCGTTGTAGCCCTCGGAGGGCCGTCATGGACAGTCCCTC  
TGGGGAGAAGAGATTCCACAGATGCAACGAGGCGGGCGGCAACAGCGACCTGCCAGGCTTTACATCTAGCCGGTCAGAT  
CTTGAGCTGGCATTGAGAAACAGGGCCTCCTTACGATCGACATGGTGGCCCTCTCGGGCGCGCACACCATCGGCCAGGC  
GCAGTGTGGGACCTTTAAGGACAGGATCTACAATGAGACTAACATCGACACGGCCTTCGCCACATCTCTCCGGGCCAACT



GCCCCAGGTCAAACGGCGACGGGAGCCTGGCGAACCTGGACACGACGACGGCCAACACGTTGATAACGCCTACTACACC  
AACCTCATGTACAGAAAGGGGCTCCTGCACTCGGACCAGGTGCTGTTCAACAACGACACCACCGACAACACTGTCCGGAA  
CTTTGCGTCGAACCCAGCGGCGTTCAGCAGCGCCTTCACGACCGCCATGATCAAGATGGGCAACATCGCGCCGAAGACAG  
GCACGCAGGGGCAGATCAGGGCTCAGCTGCTCCAGGGTGAACCTCGTGATTGATAGACGAGTTACTGCATACTAGCCAGCAC  
GACACGTACGTGAATGAATAAGGCCACAGAACCAGTGGCCAATATAAATACCAGCTCTTGAAACCGTGTATTTTATGTAC  
GAGTAGCAGCAAATCATGCATGCATCTACACATATATATGTAACGATCGAATTTCCCACTTTCTCATGCAAAGGCATGGAG  
AATTACTATCAATCTTAGTTATACGTGTATAAAAAGCGGCCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCG  
ACCTGCAGGCATGCCCCGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATAATAATGTGTGAGTAGTTCCC  
AGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTG  
TAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTCTAGTCTACGCGG  
CCGCGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTG  
TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT  
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAA  
TCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC  
GTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA  
GAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCC  
CCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTT  
CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGG  
AAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC  
ACGAACCCCCCGTTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTA  
TCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTG  
GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG  
GTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA  
AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTT  
GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT  
ATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCC  
ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACC  
GCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTG  
CAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGC  
AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACG  
ATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTA  
AGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTT  
TCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAAT  
ACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAA  
GGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACC  
AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT  
CATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTT  
AGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Fortsetzung Abbildung 5a

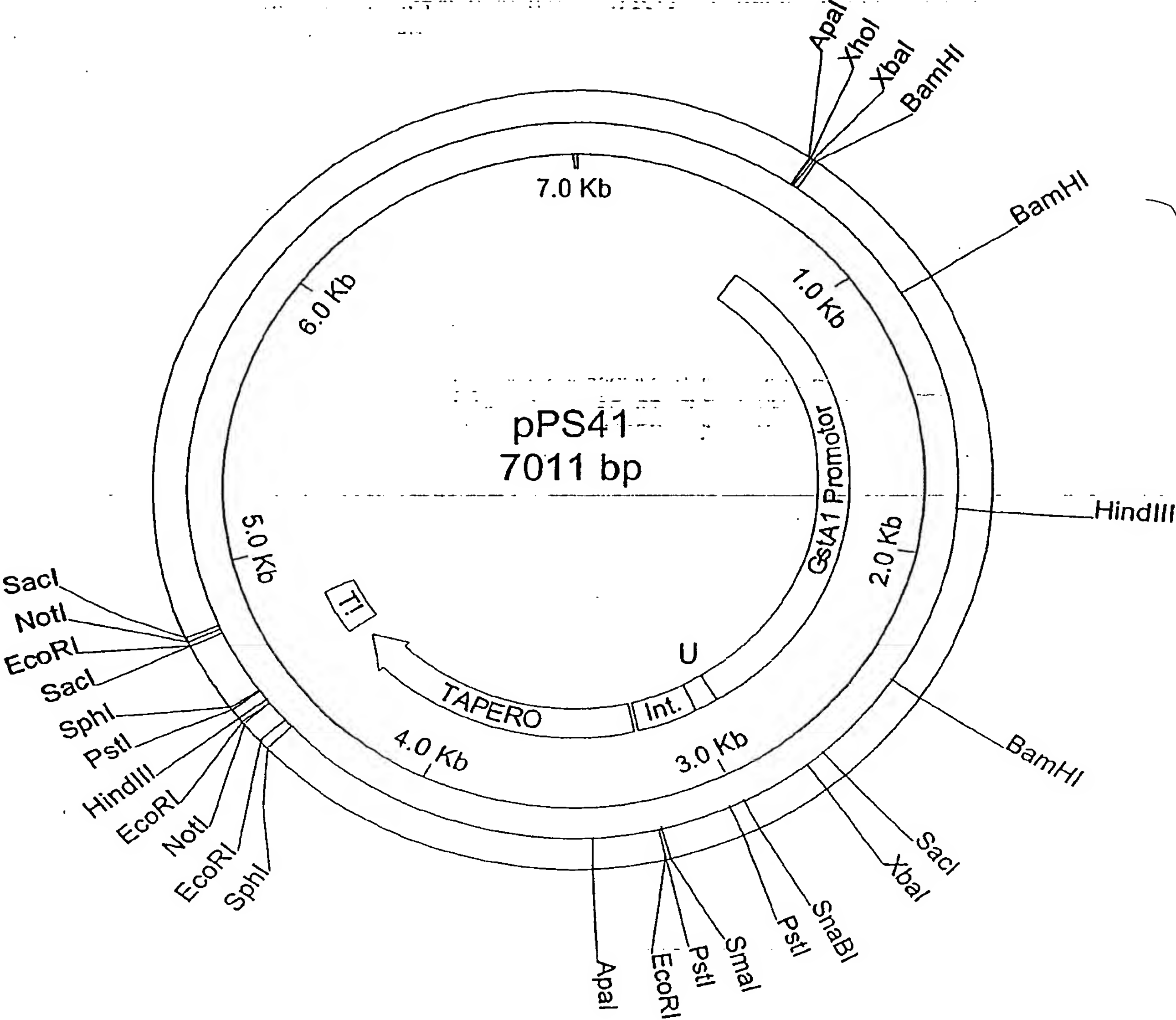


Abbildung 5b

## Abbildung 6:

Germin 9f-2.8:

AGCTTATTACATAGCAAGCATGGGGTACTCCAAAACCCTAGTAGCTGGCCTGTTTCGCAATGCTGTTACTAGCTCCGGCCG  
TCTTGGCCACCGACCCAGACCCTCTCCAGGACTTCTGTGTCGCCGACCTCGACGGCAAGGCGGTCTCGGTGAACGGGCAC  
ACGTGCAAGCCCATGTCGGAGGCCGGCGACGACTTCCTCTTCTCGTCCAAGTTGGCCAAGGCCGGCAACACGTCCACCCC  
GAACGGCTCCGCCGTGACGGAGCTCGACGTGGCCGAGTGGCCCGGTACCAACACGCTGGGTGTGTCCATGAACCGCGTGG  
ACTTTGCTCCCGGAGGCACCAACCCACCACACATCCACCCGCGTGCCACCGAGATCGGCATCGTGATGAAAGGTGAGCTT  
CTCGTGGGAATCCTTGGCAGCCTCGACTCCGGGAACAAGCTCTACTCGAGGGTGGTGC GCGCCGGAGAGACGTTCCCTCAT  
CCCACGGGGCCTCATGCACTTCCAGTTCAACGTCGGTAAGACCGAGGCCTCCATGGTCGTCTCCTTCAACAGCCAGAACC  
CCGGCATTGTCTTCGTGCCCCCTCAGCTCTTCGGCTCCAACCCGCCCATCCCAACGCCGGTGCTCACCAAGGCACTCCGG  
GTGGAGGCCAGGGTCGTGGAACCTTCTCAAGTCCAAGTTTGCCGCTGGGTTTTAATTTCTAGGAGCCTTCCCTGAAATGAT  
AATTATATAATTCCATATATGCATGC

## Abbildung 7a:

## Eigenschaften von pPS24:

Gesamtlänge: 6452 bp  
vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI  
Schnittstellen.  
GstA1 Promoter: 694-2891  
Transcription start: 2892  
GstA1 5' UTR 2892-2988  
WIR1 5' UTR (part) 2989-3034  
WIR1 part of 5' CDS + Intron 3035-3246  
Germin 9f-2.8 Gen 3258-4003  
ATG Germin 3277  
Stop codon: 3949  
CamV 35S Terminator: 4017-4210

## Sequenz:

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCG  
AAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCA  
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC  
CTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC  
GGGGAAGCCGCGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG  
GTCACGCTGCGCGTAACCAACACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTTCGCCATTCAGGCTGCG  
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT  
TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTA  
TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGTCTAGAACTAGTGGATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCC  
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGACTGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGC  
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCCTCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTG  
GGGGTCGCCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGTTCGCCGGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGC  
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGATCCGAGTCTGGGGAGAT  
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGGCGTGATCAACGAGGTGCTAGG  
CTGCTAGCTAGGGAACCTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAACTTTCTTCTTCA  
TCCACCTGATTGAGATTATTTTGTATCTAAATTAACCTGCAAAAAATATATGTGTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC  
AATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTGAAGATTTATATGCACAGTAAATCTGAATGTTCTTACATGCATGATT  
TAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGGAGCAACACCAAACCTCGTGAGGTGTTT  
TGCCTACGGAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTAGGATAAACGTAAACCTTCTCGATGTA  
TCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACTTTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATT  
CCACACTCTAGCCAAACGAACATTTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAGCCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCT  
ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAGTGATGTGTGCGCTACCAATGGGCCAACTGCTAGC  
GATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCA  
AGCTTAACTCTCGGAACCTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAAAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAA  
AATTATTCAATTGAGTGACAACGAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGTTGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTA  
CCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTTCGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCT  
ACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCCGCGTTGGAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTA  
GCGAAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACCGGATAGCCGCCATGCATGTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTG  
CTCAAGTGACACTGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGCCAACTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT  
TACAGTGTGTTTGTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTGACTACTGTGCTTACCTGCCTTCCCTT  
CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAA  
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCCTTACCGATGTTTGGGGGGCTGTGCGAAATTGGTTCCGCGATCTACA  
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCCAATCCGTACCAACGCACGTGTTTCTAACTAGTACTTACTTCTTCCGACC  
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAAGATGATTACTTACCCGGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTA  
ATTTGGCACTCATCATTTTATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATG  
TAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG  
GCCTCCTCCACACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGC  
ATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCGAAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGA  
TCGCTCTCTTCGTGCTGCTGCGCGGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCTTGGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCC  
GCCTCAGGTGAGTCGTGCGGACGGTGTCGGTTTCTTCTCCCATTTTTTGTAAATTGATTAACTTGTATACATGCTGACC  
TCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACCCCGGGGGATCCAGCTTATTACATAGCAAGCATGG  
GGTACTCCAAAACCCTAGTAGCTGGCCTGTTGCAATGCTGTTACTAGCTCCGGCCGTCTTGGCCACCGACCCAGACCCT  
CTCCAGGACTTCTGTGTCGCCGACCTCGACGGCAAGGCGGTCTCGGTGAACGGGCACACGTGCAAGCCCATGTGCGAGGC  
CGGCGACGACTTCTCTCTCTCGTCCAAGTTGGCCAAGGCCGGAACACGTCCACCCCGAACGGCTCCGCCGTGACGGAGC  
TCGACGTGGCCGAGTGGCCCGGTACCAACACGCTGGGTGTGTCCATGAACCGCGTGGACTTTGCTCCCGGAGGCACCAAC  
CCACCACACATCCACCCGCGTGCCACCGAGATCGGCATCGTGATGAAAGGTGAGCTTCTCGTGGGAATCCTTGGCAGCCT  
CGACTCCGGGAACAAGCTCTACTCGAGGGTGGTGCGCGCCGGAGAGACGTTCTCATCCACGGGGCCTCATGCACTTCC  
AGTTCAACGTCGGTAAGACCGAGGCCTCCATGGTCTCTCTTCAACAGCCAGAACCCCGGCATTGTCTTCGTGCCCCCTC  
ACGCTCTTCGGCTCCAACCCGCCCATCCCAACGCCGGTGCTCACCAAGGCACTCCGGGTGGAGGCCAGGGTCGTGGAAC  
TCTCAAGTCCAAGTTTGCCGCTGGGTTTTAATTTCTAGGAGCCTTCCCTGAAATGATAATTATATAATTCCATATATGCA

TGCCTGCAGGCATGCCCGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATAATAATGTGTGAGTAGTTCC  
CAGATAAGGGAATTAGGGTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCCTTAGTATGTATTTGTATTT  
GTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTCTAGTCTACGCG  
GCCGCGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT  
GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG  
TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA  
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT  
CGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA  
AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC  
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT  
TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGG  
GAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG  
CACGAACCCCCCGTTACGCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCTGCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT  
ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT  
GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT  
GGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA  
AAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTT  
TGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA  
TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATC  
CATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATAC  
CGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCT  
GCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGC  
CAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAAC  
GATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGT  
AAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTT  
TTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCGTCAA  
TACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCA  
AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTAC  
CAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATAC  
TCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATT  
TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Fortsetzung Abbildung 7a



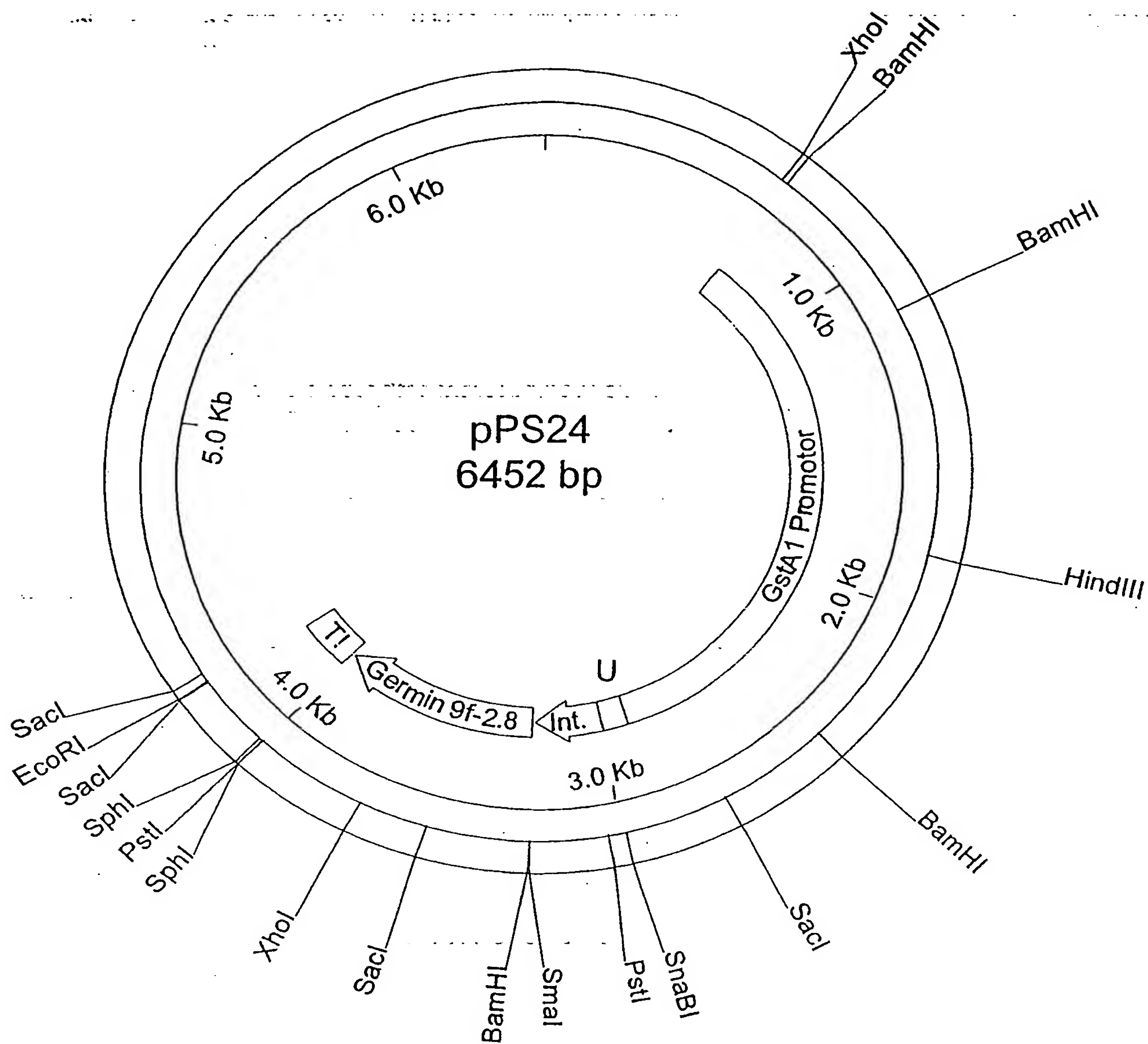


Abbildung 7b

## Abbildung 8:

TaMlo inverted repeats and MlaI Intron:

CCACTGTCCACACGAAATGTGCCATCTGAAACGCGTTCTGGAACAGCGTCAGGTGTATGAAGAAGAGGACCCAGTCGGGG  
CGGTGGAACCAGAAGAACTTGTTGCTGGGCTCGACCACGGGTGCCCCCTTGATGACGCTCGACCGGTCTGGATCTCCAG  
GGCCATCTCCATGATGATCATCTCTAGCTTGGTTCCAACACACAAGAGGATGATGAGAGGGATGAAAGAAACCCAGGTGA  
GTGTGCCGATCCCGTCGATATCAAGGAAGAGGGTGAGGATCGCCACAGCCCACAGCGGGAGGCTGCGAAAAGAGGCCAAA  
TGTGTCAAGATCATGCAACAAGGACCAGCAGGGGCAAAGACCATGACGCAGCAAACCTGATAGTATTGTATCATATGGAAG  
CTAAGCAATATCATATGGAGCCTGACGACACTCGTGCCGAATTTCGATTTCGTGAATTTCTAGAGAACAAAAGGTATGCATC  
AATTTAGAAAAAAGTACACTATTATGTGATGTTTGTTCCTATGCTAGTGGAACGGATTAGAATTTTTTTTTTCATTAAGG  
TCACCTTTACTGGCATAAGCAGTTCACACTAAACGGTAAACCTTATAGGTGAAAATTTTCAGGCATATATATATATATAT  
ATATATATATATGTTTGATTCTTTCCGGCTTAACAAAATAATTAGCAAGTACTTCTTGTTGCATTTGTTCCAACGGCTGA  
ATTTATTGGCATCGGTCCAAGAAATCCATCTAAATGTTTTACATTTACCAAAGTGTGTGTCATGACAGATGTAACAAAT  
AATAAACCAAAAGGAGAGGAAGGAAAGAGGAAGATAAATGTTACAAAATTTAAATCAAACCTTATTTCTACCTTTCTCCT  
TACCTACCCAGTTTAAAAACACATATTATATTTTAAAGAGAGGGCAACATGCGCCAAAGGCTACCCTTGAAAATTCCTAAA  
ATATTGTACATTTGACTGATGACCAAAACAAAAAGTTAAATGTTCTCTTCCTTATCACATTATATTTCCATGCATGCCTTT  
TTCTGGAAACTTACTATCAGCAAAATTTAGATGAAAGGATAATGCCACATAATTTCACTCTCCAAGAGATTTGTTAGTTG  
TCATATATTAAATTGGTGGGCCAATCTATTCTGGGTCTTTTTATGTATCTACTTGACCATTTGAACTTCTGTAGTTAAT  
TGTATTCTATGAATGATCACTCATCAAAAACCTTGTTATTTGTGTTTTACTCTGTTGAATCTTGAATATTTATTCATTTT  
GTTTCATCATAACGATTGGAGGCCCATAGATGCTTAATGAGAGTAAGATTATCGATCTCCAAACACATGCTTCTTACTA  
GTGTTGAATATATACCCTTTTAGATGTATAGTTCAACCCATAGATTTCATATGACCTCAGCTTTCTGATGTGTATGTATG  
ACCTTACACTGACACTCTGAACATAATGTAGGTATCTTGTCTGCAGGAATTCGGCAGAGTGTCTGTCAGGCTCCATATGA  
TATTGCTTAGCTTCCATATGATACAATACTATCAGTTTGCTGCGTCATGGTCTTTGCCCCTGCTGGTCCTTGTTGCATGA  
TCTTGACACATTTGGCCTCTTTTCGCAGCCTCCCGCTGTGGGCTGTGGCGATCCTCACCTCTTCCTTGATATCGACGGG  
ATCGGCACACTCACCTGGGTTTCTTTTCATCCCTCTCATCATCCTCTTGTTGTTGGAACCAAGCTAGAGATGATCATCAT  
GGAGATGGCCCTGGAGATCCAGGACCGGTGAGCGTCATCAAGGGGGCACCCGTGGTCGAGCCCAGCAACAAGTTCTTCT  
GGTTCCACCGCCCCGACTGGGTCCTCTTCTTCATACACCTGACGCTGTTCCAGAACGCGTTTCAGATGGCACATTTCTGTG  
TGGACAGGCATGCGACTGG

## Abbildung 9a:

## Eigenschaften von pWIR5-TaMlo-RNAi:

Gesamtlänge:	7633 bp
vector Backbone: pBluescript SK+, ganzes Konstrukt zwischen XhoI und SacI Schnittstellen.	
GstAI Promoter:	694-2891
Transcription start:	2892
GstAI 5' UTR	2892-2988
WIR1 5' UTR (part)	2989-3034
WIR1 part of 5' CDS + Intron	3035-3246
TaMlo IR1	3252-3556
Intron MlaI	3698-4731
TaMlo IR2	4877-5190
CamV 35S Terminator:	5191-5391

## Sequenz:

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCG  
AAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCA  
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC  
CTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC  
GGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG  
GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCCATTCAGGCTGCG  
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT  
TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTA  
TAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGTCTAGAAGTAGTGATCCCCGACGCCGAAGTGGAGCCGACAGCCCCC  
AGGTCCCAAGCCCTCGGCAGACTAGATCACTAGCCCTGGATCGGCGAGGTGACTGGATGACGAGCAGCACCTGGTCTGGC  
GGGTGTTGGGCGAGTAGAACCAGGGGCGATGGCGACGCGCTGACCTTCTCCCTCACCGGCGATCTGCTCCTTCTGGGTG  
GGGGTCGCCGGCTGACGTTCTGTTGCGGGGTGGGGGTCGCCGCTGGCGTTCTGCTGCGGGGTGGGAGTCGCCGACCGGC  
GTGCTGCTGCTAGGACAATCGGTGAGGCCAGTTAGGTGCTAGCCGATCGATTGGCGAAGAGATCCGAGTCTGGGGAGAT  
CAGTGAGGCCAGGTGCTATTTGGCCTATCAATTGGCCAGGTTCTGGGAACGGGGCGTGCGGTGATCAACGAGGTGCTAGG  
CTGCTAGCTAGGGAAGTGGATCCTGGAACGTGGAGGAGGCAAGTCCGGTATGCTAAGTACTTTAACTTTCCTTCTTCACA  
TCCACCTGATTGAGATTATTTTGATCTAAATTAAGTGAACCAATATATGTGTGATATCCATCTACTATAATTGCTTAC  
AATCAAAATTATATGTGATTTTTTTTAGTTTGAAGATTTATATGCACAGTAAATCTGAATGTTCTTCACATGCATGATT  
TAGTTTAACTTTAAAGAGTTATACTAACTAGTCTTGATAAAGAGATCTTTTGGAGCAACACCAACCTCGTGAGGTGTTT  
TGCTTACGGAAGGTTGTGCTATGTAATGATTATTATTAGGATCAAAGTTGTAGGATAAACGTAAACCTTCTCGATGTA  
TCTTTTATACAACATTGTAGTTTAGTTATATATGGAGAGAGTGATTTAACACTTTGTGTTTAAAGAGTAGAATAAGTTATT  
CCACACTCTAGCCAAACGAACATTTTGGCAAATATCTCGCTAGCTGGTGAGAGCCAGAGCCGTGGAAAGTCTGTCTTGCT  
ATTAAGGCACAAGCATCAAACAGGAACATTTAGAGCCATGGAAAAGTGATGTGTCGCCCTACCAATGGGGCAACTGCTAGC  
GATGTAATAATAGCATCCAAGTTGATTTTTTATAGAACATGCAAGGCGTTGGCAAGTGGGAAAATGATTGATCGCTGGCA  
AGCTTAACTCTCGGAAGTTATAGCATTCAACTGAATCAGAACAAAGATTAAAAAAAATACATTTCCATCGATAGTGAAA  
AATTATTCAATTGAGTGACAACGAAATCATATTGGAATGTACATTTACTTGTGATTTTAAATTAGAGGCATTTTTCTA  
CCTTTTTTAGTTAATAAGATATGCATATACCCACCCTTAGTGTTTTCGAGACAACGAGAGGGCACATTGCTTTTGGTGCT  
ACCATCTCTCTCAAGCCTCAAATAAGTTGTGCGGACACGATTATCTTCCGCGTGGAAATATCGTGGCCTGGTAGAGCTA  
GCGAAAATCTTCCATGTTGGAATATGTGCGGACGCCGATAGCCGCCATGCATGTAAAGTCTCTTTTACCTTTACACTTG  
CTCAAGTGACACTGTATGTGCGCTACCACTTGCTAAATCAATGGGGCAACTGCTAGCGACGTAATAGTAGCAAGTTGATT  
TACAGTGTGTTGCTACAGTTCTCTGACTTTGTTTCTTCATTTTAGACTAGCTGACTACTGTCGCTTACCTGCCTTCCCTT  
CTCCACGTTAGAGGATCCAGTTCTGATATTGAGACCTCGACGATGGGAGGAAGGGCGCGATCGATGTGGAGTAATTTGAA  
TTTCAAATCTATCTATCTGGGGTATATTGGTCTTCCACCGATGTTTGGGGGGCTGTCGGAAATTGGTTCCGCGATCTACA  
AAAGTGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTCAATCCGTACCAACGCACGTGTTTCTAACTAGTACTTACTTCTTCCGACC  
ACAATATGGAATAGAGGGAGTATCGATAAACTAACAAGATGATTACTTACCGGTTTAAATGATTCAAGAGCTCATTTA  
ATTTGGCACTCATCATTTTCATATATCTTTTTTGGTAGAAATGAAATAAAGCAGATCTAGACACTAGCTAAAAAGTCGATG  
TAGCCTTGTTATTTCTTGGGCCACGCGGGCCGGGTGTGGTGCTCCCTGCTCTGTGTATAAATGGAGATCAACATCCAAG  
GCCTCCTCCACACACACACGCTACAGAGCAGAGCAGAGTCTTGCTCCAGTATCTGCCCTCTCCTGCCTGCCTGTAGAGC  
ATCCATCACGTGAAGTTCACGGACAACTACGTACACAGGCAGCTAGCTCTCGAAACCTCGCTCGAAACGCACCTGCAGA  
TCGCTCTCTTCGTGCTCGTCCGCGATCATCATCAACAGCTCCGTCTGCCTTGGAGCCACGGCCGTCCACGACGCCGCC  
GCCTCAGGTGAGTCGTGCGGACGGTGTCGGTTCAATTTCTCCCATTTTTGTAATTGATTAACTTGTATACATGCTGACC  
TCGACCTGCTGAATAACGTCCGTCCATGGTTTCCCGTCCAGGCACCCCGGGCCACTGTCCACACGAAATGTGCCATCTGA  
AACGCGTTCTGGAACAGCGTCAGGTGTATGAAGAAGAGGACCCAGTCGGGGCGGTGGAACCAGAAGAACTTGTGCTGGG  
CTCGACCACGGGTGCCCCCTTGATGACGCTCGACCGGTCTGGATCTCCAGGGCCATCTCCATGATGATCATCTCTAGCT  
TGGTTCCAACACACAAGAGGATGATGAGAGGGATGAAAGAAACCCAGGTGAGTGTGCCGATCCCGTCGATATCAAGGAAG  
AGGGTGAGGATCGCCACAGCCACAGCGGGAGGCTGCGAAAAGAGGCCAAATGTGTCAAGATCATGCAACAAGGACCAGC  
AGGGGCAAAGACCATGACGCAGCAAACCTGATAGTATTGTATCATATGGAAGCTAAGCAATATCATATGGAGCCTGACGAC  
ACTCGTGCCGAATTCGATTCTGTAATTTCTAGAGAACAAAAGGTATGCATCAATTTAGAAAAAGTACACTATTATGTGA  
TGTTTGTTCCTATGCTAGTGGAACGGATTAGAATTTTTTTTTTCATTAAGGTCACCTTTACTGGCATAAGCAGTTCACAC

TAAACGGTAAACCTTATAGGTGAAAATTTTCAGGCATATATATATATATATATATATATATGTTTGATTCTTTCCGGC  
TTAACAAAATAATTAGCAAGTACTTCTTGTTGCATTTGTTCCAACGGCTGAATTTATTGGCATCGGTCCAAGAAATCCAT  
CTAAATGTTTTACATTTACCAAAGTGTGTGTCATGACAGATGTAACAAATAATAAACCAAAGGAGAGGAAGGAAAGAG  
GAAGATAAATGTTACAAAATTTAAATCAAACCTTATTTCTACCTTTCTCCTTACCTACCCAGTTTAAAAACACATATTAT  
ATTTTAAAGAGAGGCAACATGCGCCAAAGGCTACCCTTGAAAATTCCTAAAATATTGTACATTTGACTGATGACCAAACA  
AAAAGTTAAATTGTCTCTTCCTTATCACATTATATTTCCATGCATGCCTTTTTCTGGAACTTACTATCAGCAAAATTTA  
GATGAAAGGATAATGCCACATAATTTCAAGTCTCCAAGAGATTTGTTAGTTGTCATATATTAAATTGGTGGGCCAATCTAT  
TCCTGGGTCTTTTTATGTATCTACTTGACCATTTGAACTTCTGTAGTTAATTGTATTCTATGAATGATCACTCATCCAAA  
AACTTGTTATTTGTGTTTTACTCTGTTGAATCTTGAATATTTATTCATTTTGTTTCATCATACGATTGGAGGCCATAATA  
GATGCTTAATGAGAGTAAGATTATCGATCTCAAACACATGCTTCTTACTAGTGTGAATATATACCCTTTTAGATGTAT  
AGTTCAACCCATAGATTCATATGACCCTCAGCTTTCTGATGTGTATGTATGACCTTACACTGACACTCTGAACTAATGTA  
GGTATCTTGTCTGCAGGAATTCGGCACGAGTGTGTCAGGCTCCATATGATATTGCTTAGCTTCCATATGATACAATAC  
TATCAGTTTGCTGCGTCATGGTCTTTGCCCTGCTGGTCTTGTGTCATGATCTTGACACATTTGGCCTCTTTTCGCAGC  
CTCCCGCTGTGGGCTGTGGCGATCCTCACCTCTTCCTTGATATCGACGGGATCGGCACACTCACCTGGGTTTCTTTCAT  
CCCTCTCATCATCCTCTTGTGTGTTGGAACCAAGCTAGAGATGATCATCATGGAGATGGCCCTGGAGATCCAGGACCGGT  
CGAGCGTCATCAAGGGGGCACCCGTGGTTCGAGCCAGCAACAAGTTCTTCTGGTTCACCGCCCCGACTGGGTCTCTTC  
TTCATACACCTGACGCTGTTCCAGAACGCGTTTCAGATGGCACATTTCTGTGTGGACAGGCATGCGACTGGGCATGCCCGC  
TGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATAATAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAGGGAATTAGGGT  
TCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAATACTTCTATCAAT  
AAAATTTCTAATTCTTAAACCAAATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTTCTAGTCTACGCGGCCGCGAGCTCCAGCTTTT  
GTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC  
ACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT  
TGCCTTGCCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA  
GAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTTGGCTGCGGCGAGCG  
GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGG  
CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA  
AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC  
GTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCA  
TAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGACGAACCCCCGTTTACG  
CCGACCCTGCGCCTTATCCGGTAACATCTGCTTGTAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC  
ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC  
TAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA  
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGAT  
CCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAACTCACGTTAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAA  
AAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTG  
ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC  
GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC  
GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCA  
TCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCT  
ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATG  
ATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTAT  
CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTAC  
TCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCC  
ACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGA  
GATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCA  
AAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCA  
ATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAG  
GGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Fortsetzung Abbildung 9a

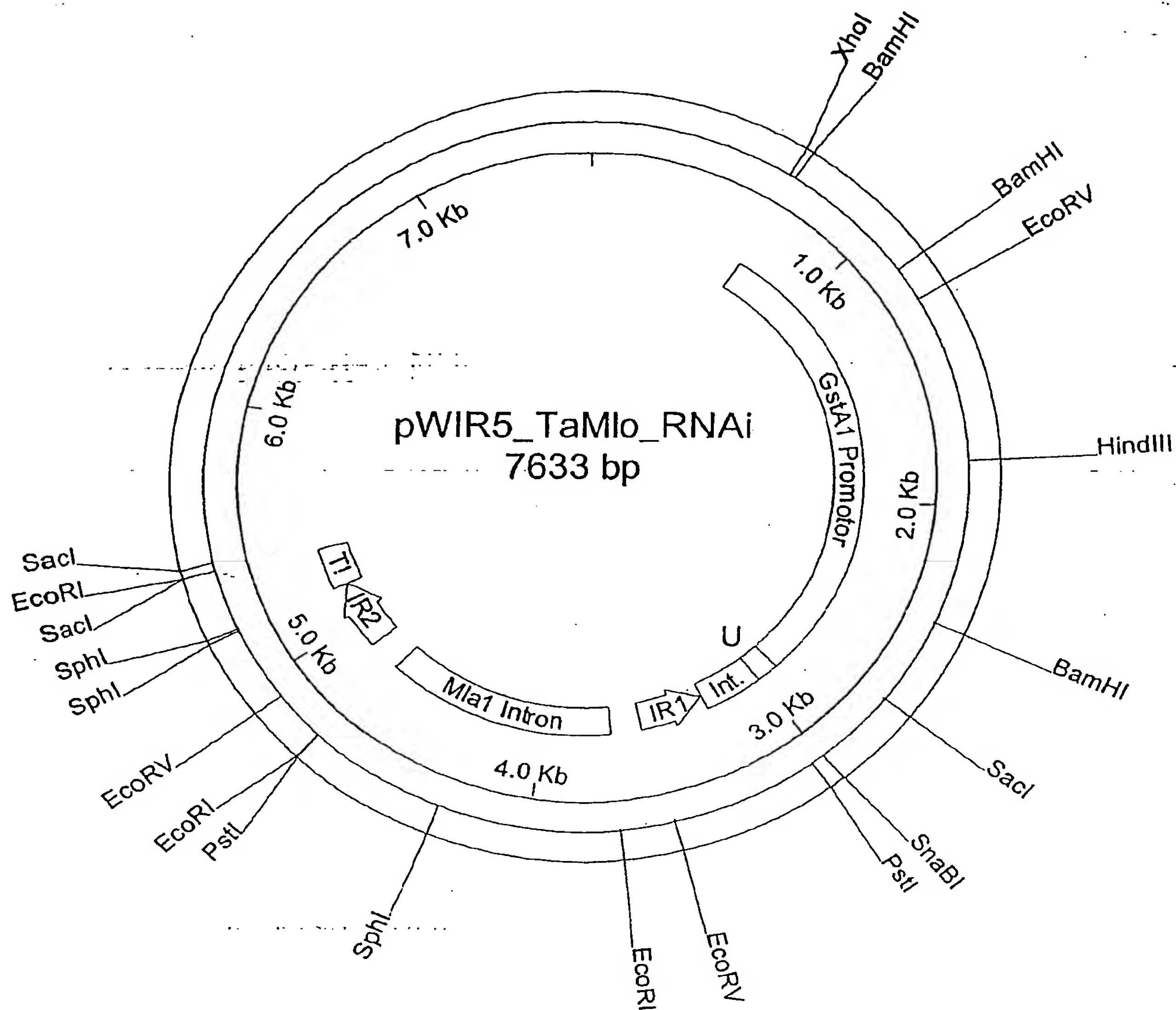


Abbildung 9b



Abbildung 10:

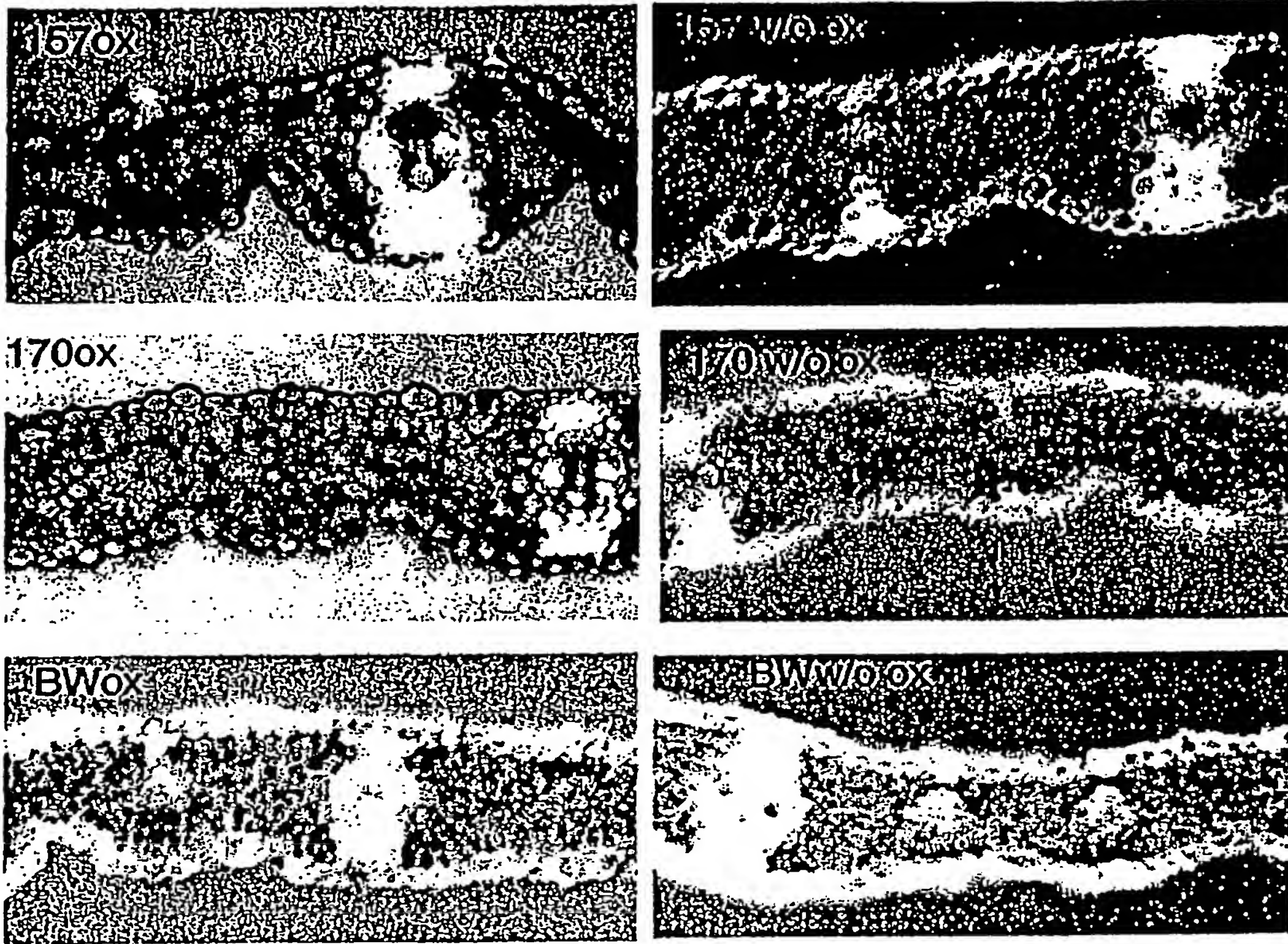
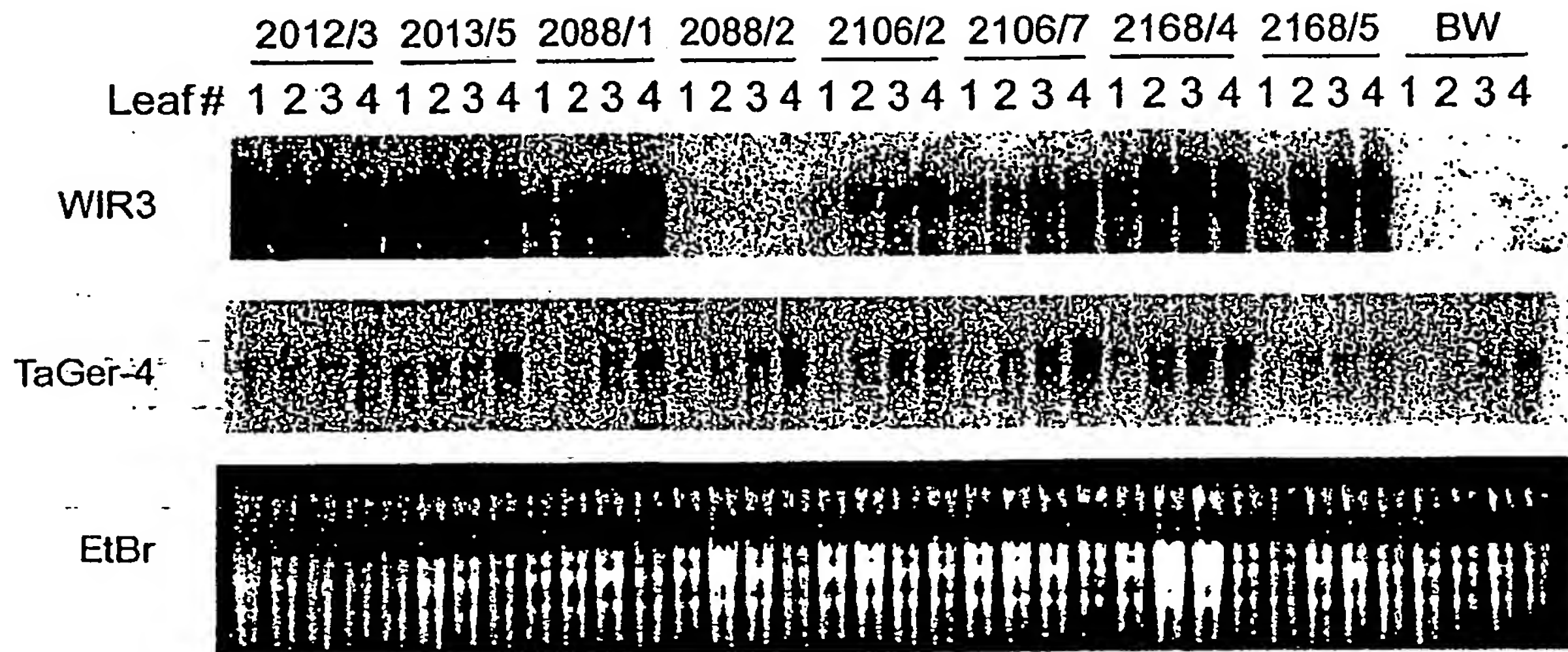




Abbildung 11:

a)



b)

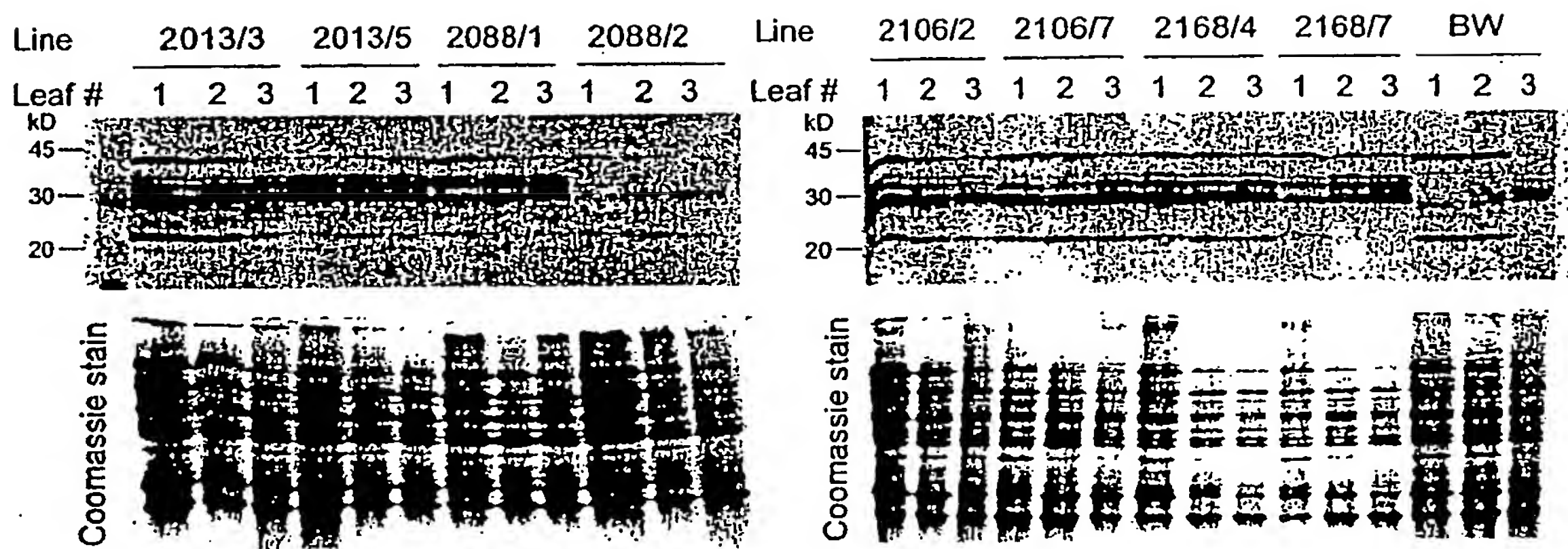


Abbildung 12

**A**

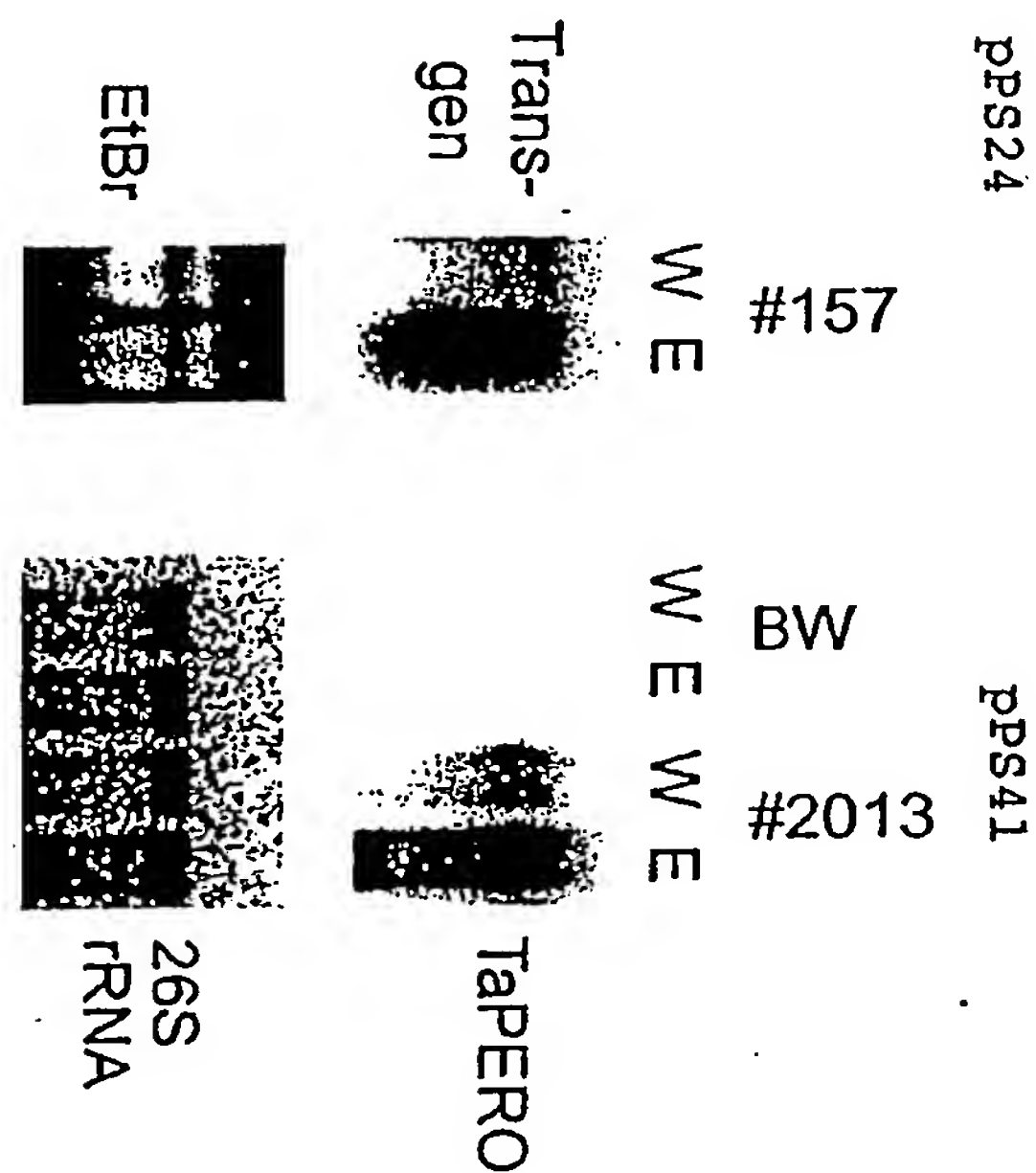
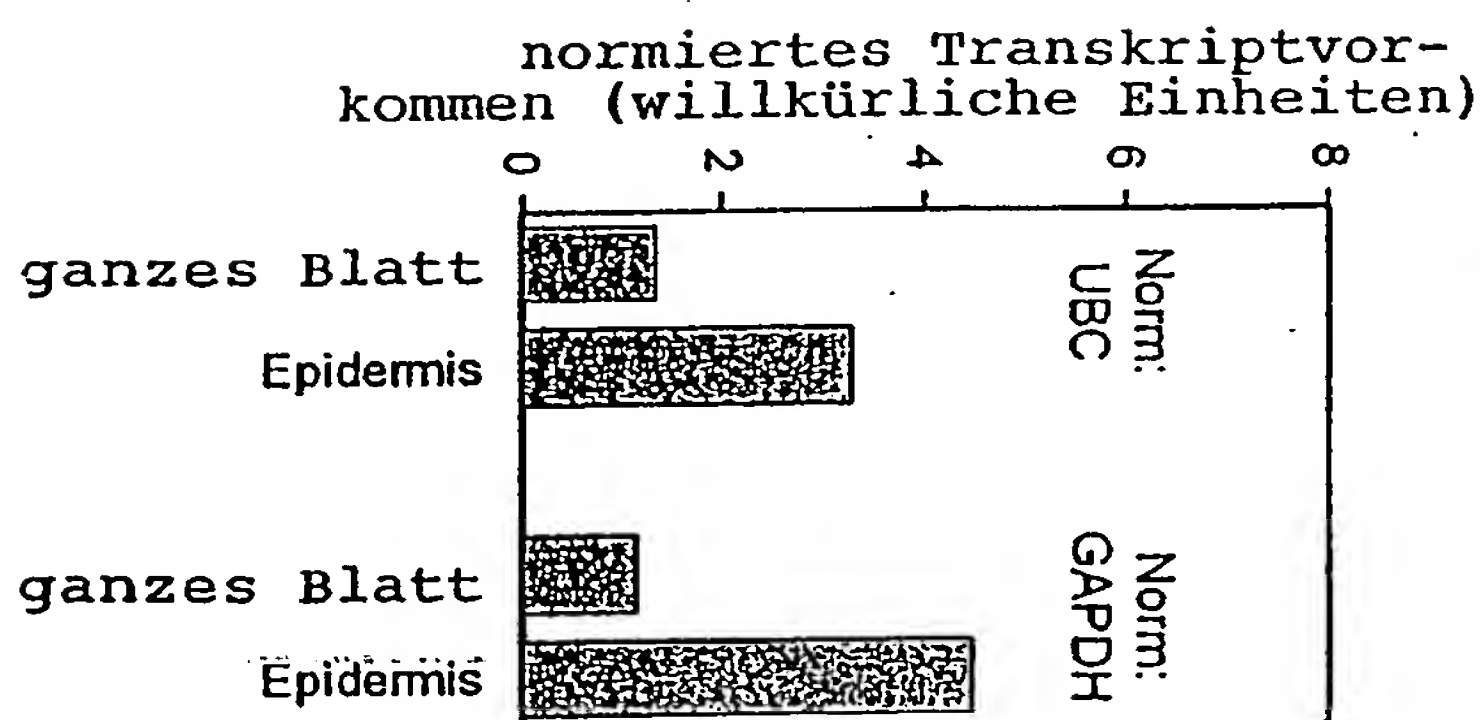


Abbildung 12

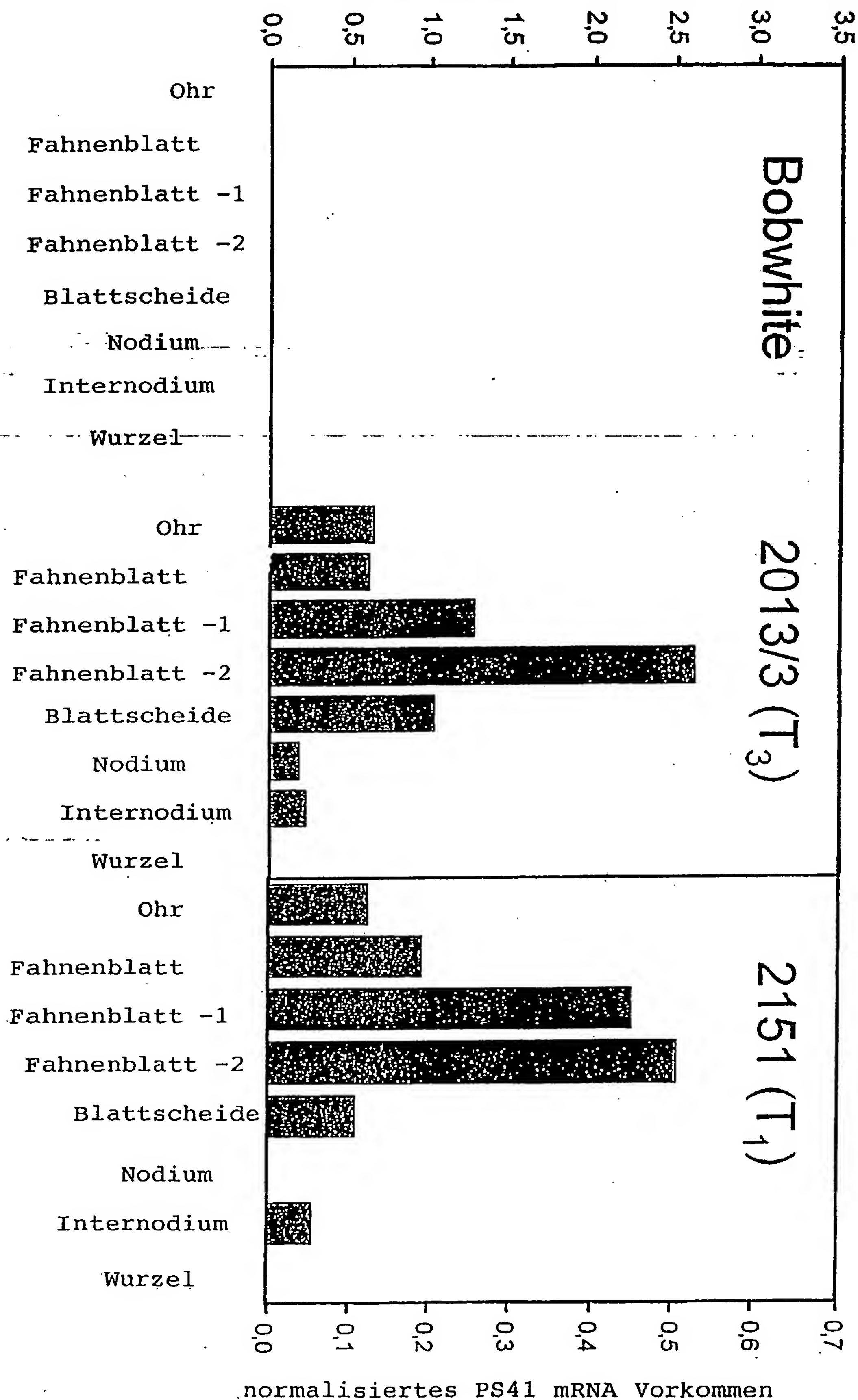
**B**



19/22

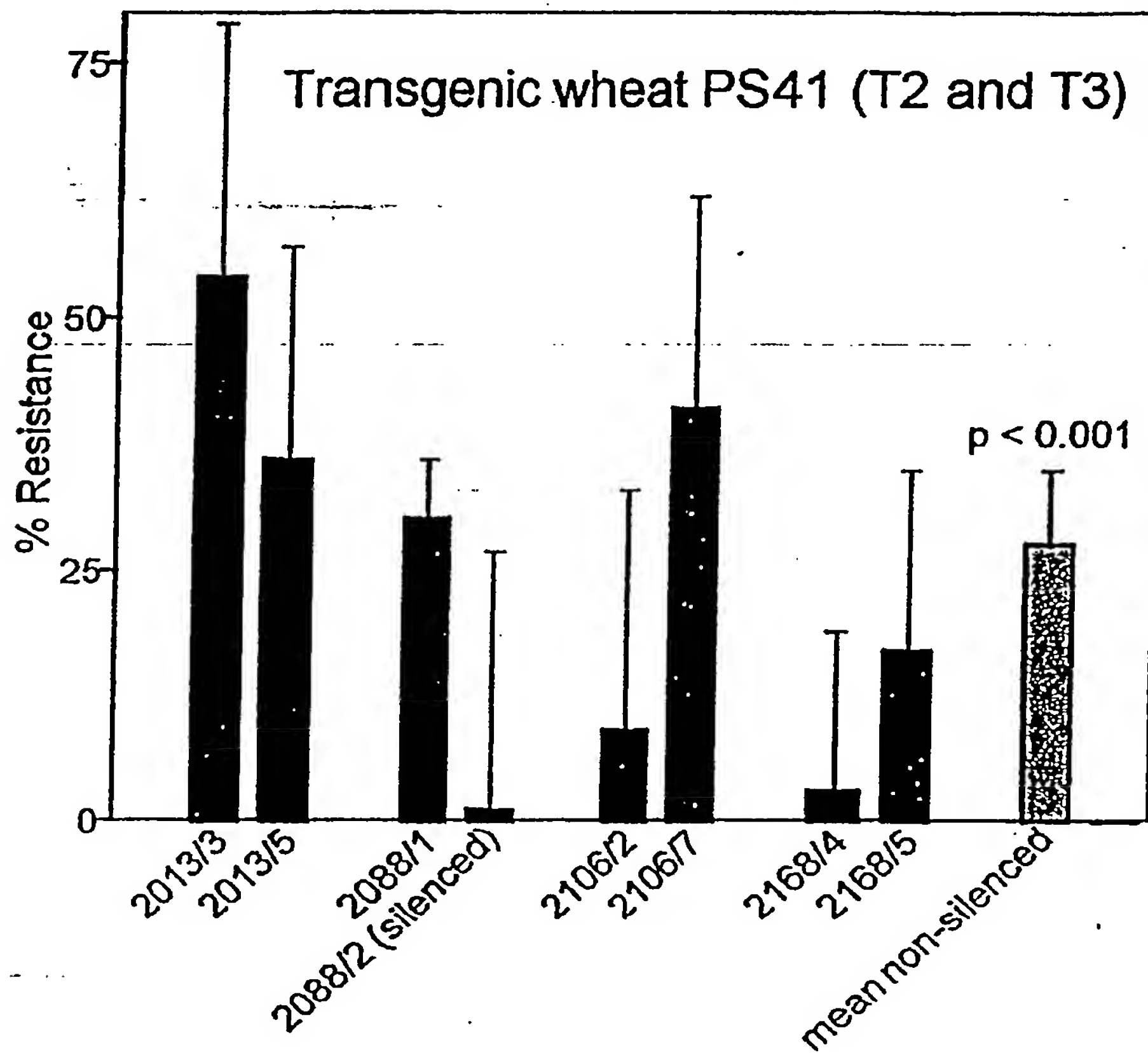
normalisiertes PS41 mRNA Vorkommen

Abbildung 12 C



## Abbildung 13

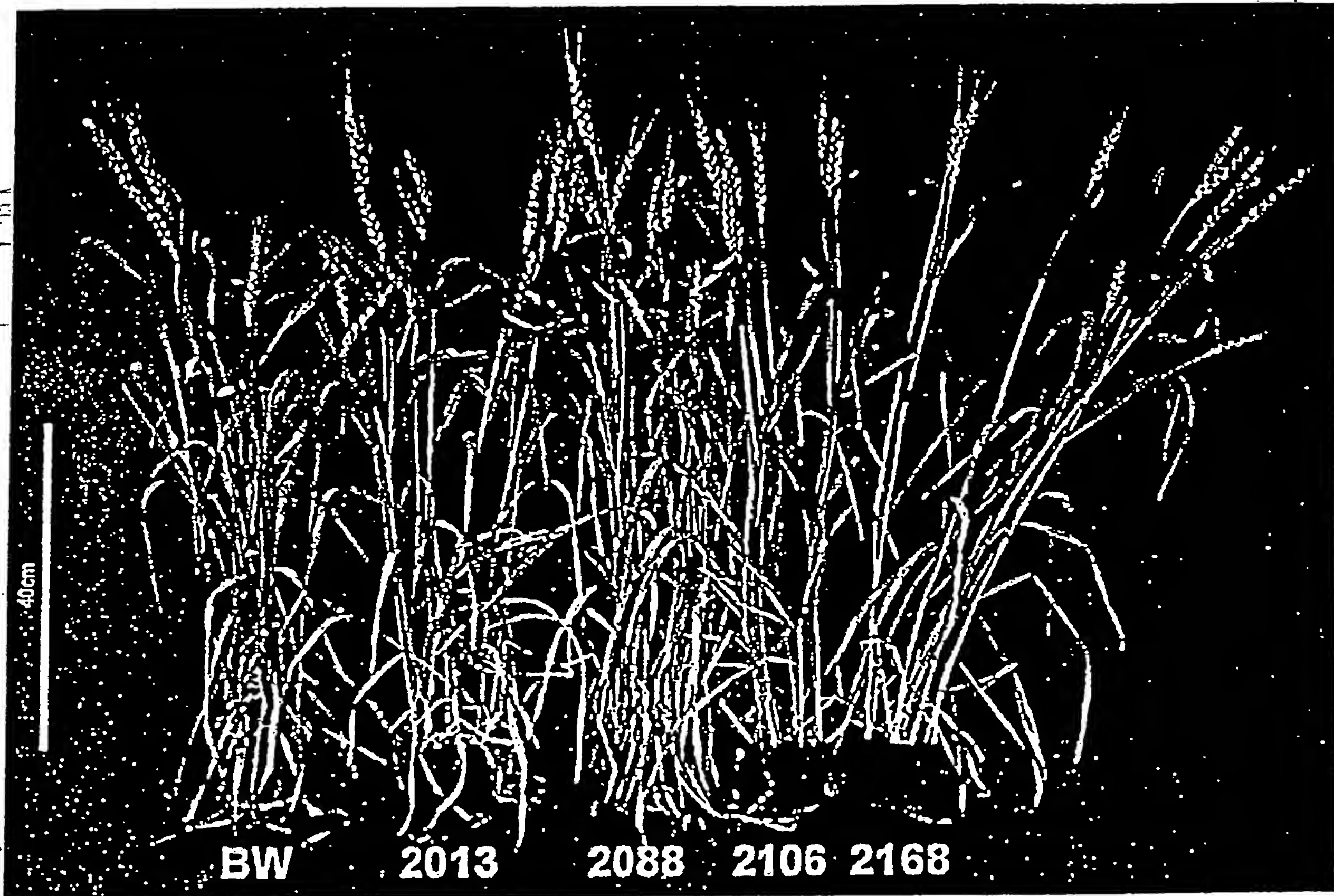
Mehltauresistenz von transgenen Weizenlinien, die das pPS41 Konstrukt tragen.



Das Fahnenblatt adulter Pflanzen wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Mittelwerte aus 3 unabhängigen Inokulationsexperimenten mit Pflanzen der T2 und T3 Generation. Sublinie 2088/2 exprimiert kein TAPERO und ist nicht erhöht resistent. Mean non-silenced = Mittelwert aus allen Linien außer 2088/2 und allen Experimenten.

**Abbildung 14**

Normaler Wachstumsphänotyp transgener Pflanzen, die das pPS41 Konstrukt tragen.

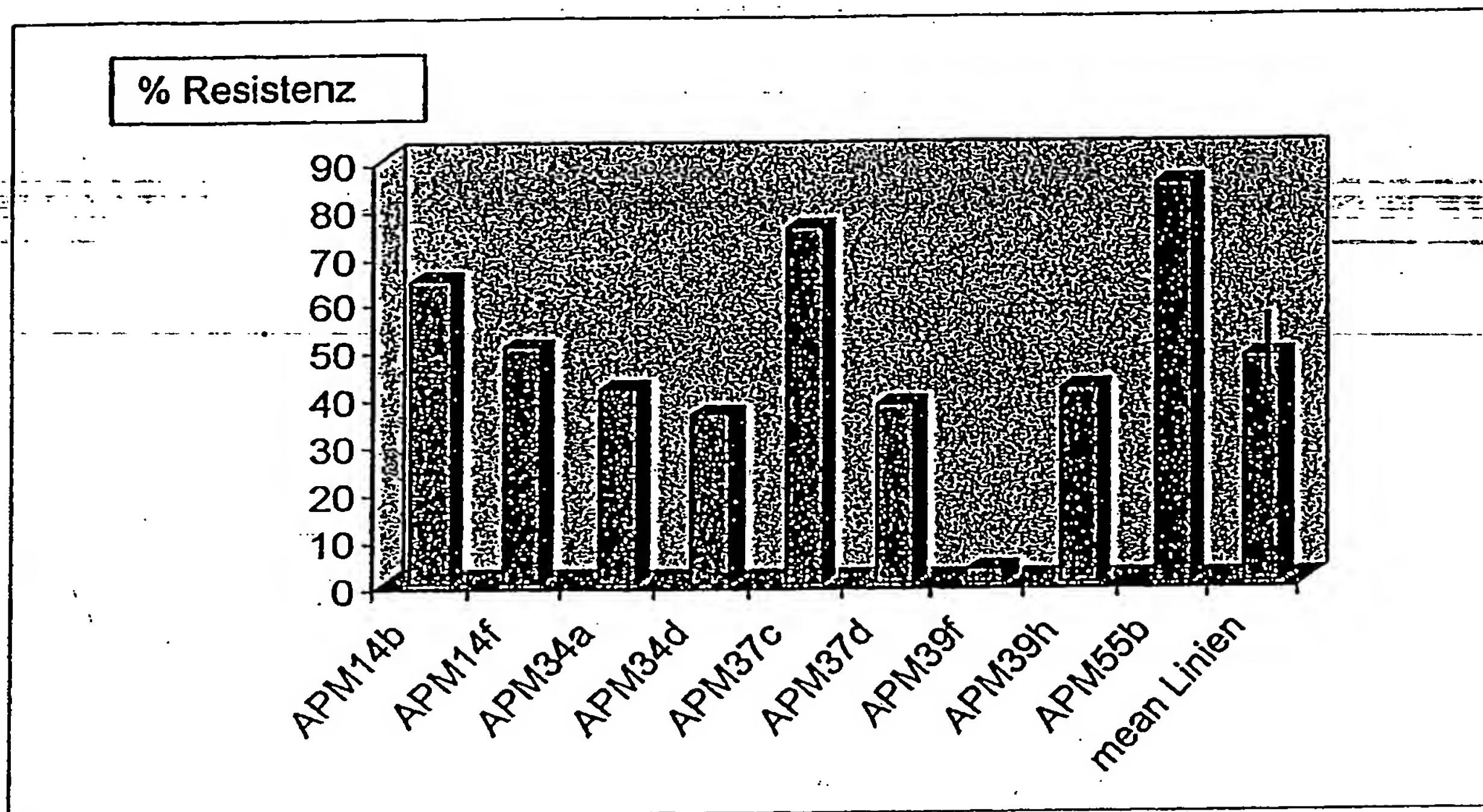


Pflanzen der T2 Generation wurden zusammen mit Bobwhite Widtyppflanzen ausgesät und im Adultpflanzenstadium fotografiert.



## Abbildung 15

Mehltauresistenz von transgenen Weizenlinien, die das pWIR5-TaMlo-RNAi Konstrukt tragen.



Das Fahnenblatt adulter Pflanzen der T2 Generation wurde abgeschnitten und in einem „detached leaf assay“ mit Weizenmehltau inokuliert, zusammen mit Bobwhite Wildtyppflanzen. 7 Tage nach Inokulation wurde der Mehлтаubefall bonitiert. Je 2 Sublinien pro Linie wurden getestet.



## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; IPK Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanze

<120> Promotor zur epidermisspezifischen Transgenexpression  
in Pflanzen

&lt;130&gt; I 7469

&lt;140&gt; DE 103 46 611.8

&lt;141&gt; 2003-10-07

&lt;160&gt; 15

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2198

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum sp.

&lt;400&gt; 1

```
gacgccgaag tggagccgac agcccccagg tcccaagccc tcggcagact agatcactag 60
ccctggatcg gcgaggtgac tggatgacga gcagcacctg gtctggcggg tggtgggcga 120
gtagaaccag gggcgatggc gacgcgctga ccttctcccc tcaccggcga tctgctcctt 180
ctgggtgggg gtgcgccggt gacgttctgt tgcgggggtg gggtcgccgg ctggcgcttct 240
gctgcggggg gggagtcgcc gaccggcgtg ctgctgctag gacaatcggt gaggccagtt 300
aggtgctagc cgatcgattg gcgaagagat ccgagtcctg gggagatcag tgaggccagg 360
tgctatttgg cctatcaatt ggccagggtt tgggaacggg gcgtggcgtg atcaacgagg 420
tgctaggctg ctgctaggg aactggatcc tggaacgtgg aggaggcaag tccggtatgc 480
taagtacttt aactttcctt cttcacatcc acctgattca gattattttg atctaaatta 540
acttgcaaaa aatatatgtg tgatatccat ctactataat tgcttacaat caaaattata 600
tgtgattttt tttagtttag aagatttata tgcacagtaa atctgaatgt tcttcacatg 660
catgatttag ttttaacttta aagagttata ctaactagtc ttgataaaga gatcttttgg 720
agcaacacca aacctcgtga ggtgttttgc ctacggaaag gttgtgctat gtaatgatta 780
ttattaggat caaagttgta ggataaacgt aaaaccttct cgatgtatct tttatacaac 840
attgtagttt agttatatat ggagagagtg atttaacact ttgtgtttta gagtagaata 900
agttattcca cactctagcc aaacgaacta tttggcaaat atctcgctag ctggtgagag 960
ccagagccgt ggaaagtctg tcttgctatt aaggcacaag catcaaacag gaacatttag 1020
agccatggaa aagtgatgtg tcgcctacca atgggccaac tgctagcgat gtaataatag 1080
catccaagtt gattttttat agaacatgca aggcgttggc aagtgggaaa atgattgatc 1140
gctggcaagc ttaactctcg gaacttatag cattcaactg aatcagaaca aagattaaaa 1200
aaaaatacat ttccatcgat agtgaaaaat tattcaattg agtgacaacg aaaatcatat 1260
tggaatgtac atttacttgt tgattttaaa ttagaggcat ttttctacct tttttagtta 1320
ataagatatg catataccca cccttagtgt tttcgagaca acgagagggc acattgcttt 1380
tggtgctacc atctctctca agcctcaaat aagttgtgcg gacacgatta tcttcccgcg 1440
ttggaatata gtggcctggg agagctagcg aaaaatcttc catgttggaa tatgtcggca 1500
gcgggatagc cgccatgcat gtaaagtctc ttttaccttt acacttgctc aagtgacact 1560
gtatgtcgcc taccacttgc taaatcaatg ggccaactgc tagcgacgta atagtagcaa 1620
gttgatttac agtgttttgc tacagttctc tgactttggt tcttcatttt agactagctg 1680
actactgtcg cttacctgcc ttcccttctc cacgttagag gatccagttc tgatattgag 1740
acctcgacga tgggaggaag ggcgcgatcg atgtggagta atttgaattt caaatctatc 1800
tatctggggg atattggtcc ttcaccgatg tttggggggc tgtcggaaat tggttccgcg 1860
atctacaaaa gtgaatggag ggagtagttg tttctccaat ccgtaccaac gcacgtgttt 1920
ctaactagta cttacttcct tcgcaccaca atatggaata gagggagtat cgataaacta 1980
acaaagatga ttacttacct ggttttaaat attcaagagc tcattttaatt tggcactcat 2040
catttcatat atcttttttg gtagaaatga aataaagcag atctagacac tagctaaaaa 2100
gtcgatgtag ccttgttatt tccttgggcc acgcggggcg ggtgtggtgc tccctgctct 2160
gtgtataaat ggagatcaac atccaaggcc tcctccca 2198
```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum sp.

&lt;400&gt; 2

gtcagtcgtc ggacggtgtc cgttcatttc ctccccattt ttgtaattga ttaacttgtt 60  
atacatgctg acctcgacct gctgaataac gtccgtccat ggtttcccgt ccag 114

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2553

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum sp.

&lt;400&gt; 3

gacgccgaag tggagccgac agccccaggg tcccaagccc tcggcagact agatcactag 60  
ccctggatcg gcgaggtgac tggatgacga gcagcacctg gtctggcggg tgttgggcca 120  
gtagaaccag gggcgatggc gacgcgctga ccttctcccc tcaccggcga tctgctcctt 180  
ctgggtgggg gtcgccggct gacgttctgt tgcgggggtg gggtcgccgg ctggcgcttct 240  
gctgcggggg gggagtcgcc gaccggcgtg ctgctgctag gacaatcggg gaggccagtt 300  
aggtgctagc cgatcgattg gcgaagagat ccgagtcctg gggagatcag tgaggccagg 360  
tgctatcttg cctatcaatt ggccagggtc tgggaacggg gcgtggcgtg atcaacgagg 420  
tgctaggctg ctagctaggg aactggatcc tggaaacgtg aggaggcaag tccggtatgc 480  
taagtacttt aactttcctt cttcacatcc acctgattca gattatcttg atctaaatta 540  
acttgcaaaa aatataatgt tgatatccat ctactataat tgcttacaat caaaattata 600  
tgtgattttt tttagtttag aagatttata tgcacagtaa atctgaatgt tcttcacatg 660  
catgatttag ttttaacttta aagagttata ctaactagtc ttgataaaga gatcttttgg 720  
agcaacacca aacctcgtga ggtgttttgc ctacggaaag gttgtgctat gtaatgatta 780  
ttattaggat caaagttgta ggataaacgt aaaaccttct cgatgtatct tttatacaac 840  
attgtagttt agttatataat ggagagagtg atttaacact ttgtgtttta gagtagaata 900  
agttattcca cactctagcc aaacgaacta tttggcaaat atctcgctag ctggtgagag 960  
ccagagccgt ggaaagtctg tcttgctatt aaggcacaag catcaaacag gaacatttag 1020  
agccatggaa aagtgatgtg tcgcctacca atgggccaac tgctagcgat gtaataatag 1080  
catccaagtt gattttttat agaacatgca aggcgttggc aagtgggaaa atgattgatc 1140  
gctggcaagc ttaactctcg gaacttatag cattcaactg aatcagaaca aagattaaaa 1200  
aaaaatacat ttccatcgat agtgaaaaat tattcaattg agtgacaacg aaaatcataat 1260  
tggaatgtac atttacttgt tgatttttaa ttagaggcat ttttctacct ttttttagtta 1320  
ataagatatg catataccca cccttagtgt tttcgagaca acgagagggc acattgcttt 1380  
tggtgctacc atctctctca agcctcaaat aagttgtgcg gacacgatta tcttcccgcg 1440  
ttggaatate gtggcctggt agagctagcg aaaaatcttc catgttggaa tatgtcggca 1500  
gccggatagc cgccatgcat gtaaagtctc ttttaccttt acacttgctc aagtgacact 1560  
gtatgtcgcc taccacttgc taaatcaatg ggccaactgc tagcgacgta atagtagcaa 1620  
gttgatttac agtgttttgc tacagttctc tgactttgtt tcttcatttt agactagctg 1680  
actactgtcg cttacctgcc ttcccttctc cactgttagag gatccagttc tgatattgag 1740  
acctcgacga tgggaggaag ggcgcgatcg atgtggagta atttgaattt caaatctatc 1800  
tatctggggg atattggtcc ttcaccgatg tttggggggc tgtcggaaat tggttccgcg 1860  
atctacaaaa gtgaatggag ggagtagttg tttctccaat ccgtaccaac gcacgtgttt 1920  
ctaactagta cttacttctt tcgcaccaca atatggaata gagggagtat cgataaacta 1980  
acaaagatga ttacttacct ggttttaaat attcaagagc tcattttaatt tggcactcat 2040  
catttcataat atcttttttg gtagaaatga aataaagcag atctagacac tagctaaaaa 2100  
gtcgatgtag ccttggttatt tccttgggcc acgcggggcg ggtgtggtgc tccctgctct 2160  
gtgtataaat ggagatcaac atccaaggcc tcctcccaca cacacacgct acagagcaga 2220  
gcagagtctt gctccagtat ctgccctctc ctgcctgcct gtagagcatc catcacgtga 2280  
agttcacgga caaactacgt acacaggcag ctagctctcg aaacctcgct cgaaacgcac 2340  
ctgcagatcg ctctcttcgt cgtcgtcgcc gcgatcatca tcaacagctc cgtctgcctt 2400  
ggagccacgg ccgtccacga cgccgcgcgc tcaggtcagt cgtcggacgg tgtccgttca 2460  
tttctctccc atttttgtaa ttgatttaact tgttatacat gctgacctcg acctgctgaa 2520  
taacgtccgt ccattggttc ccgtccaggc acc 2553

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1246

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum sp.

&lt;400&gt; 4

```

accaccacac cactccacca gtaagaagtg cagcaggtag ctagtaagcc ggcgtagctt 60
tgctcttgca gctagctagc taaccatggc cgcctctgcc tcttgccctt ctcttggtgt 120
gctcgtggct ctggccacgg cggcgtcggc gcagctgtca ccgaccttct acgacacgtc 180
ctgccccagg gccctggcca tcatcaagag tggcgctcat gccgccgtga gcagcgaccc 240
tcggatgggc gcgtcgctgc tccggctgca cttccacgac tgcttcgtcc aaggctgcga 300
cgcgctctgt ttgctgtctg gcatggaaca aaatgctatc ccgaacgcgg ggtcgctgag 360
gggcttcggc gtcacogaca gcatcaagac gcagatcgag gccatctgca atcagaccgt 420
ctcctgcgcc gacatcctca ccgtcgccgc ccgtgactcc gttgtagccc tcggagggcc 480
gtcatggaca gtccctctgg ggagaagaga ttccacagat gcaaacgagg cggcggcaaa 540
cagcgacctg ccaggcttta catctagccg gtcagatctt gagctggcat tcagaaacaa 600
gggcctcctt acgatcgaca tgggtggcct ctcggggcgc cacaccatcg gccaggcgca 660
gtgtgggacc tttaaggaca ggatctacaa tgagactaac atcgacacgg ccttcgccac 720
atctctccgg gccaaactgcc ccagggtcaaa cggcgacggg agcctggcga acctggacac 780
gacgacggcc aacacgttcg ataacgccta ctacaccaac ctcatgtcac agaaaggggt 840
cctgcactcg gaccaggtgc tgttcaacaa cgacaccacc gacaacactg tccggaactt 900
tgcgtcgaac ccagcggcgt tcagcagcgc cttcacgacc gccatgatca agatgggcaa 960
catcgccggc aagacaggca cgcaggggca gatcaggctc agctgctcca gggtagaactc 1020
gtgattgata gacgagttac tgcatactag ccagcacgac acgtacgtga atgaataagg 1080
ccacagaacc agtggccaat ataaatacca gctcttgaaa ccgtgtattt tatgtacgag 1140
tagcagcaaa tcatgcatgc atctacacat atatatgtaa cgatcgaatt cccactttct 1200
catgcaaagg catggagaat tactatcaat cttagttata cgtgta 1246

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 7011

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum sp.

&lt;400&gt; 5

```

ctaaattgta agcgttaata ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc 60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
gataggggtg agtgttggtc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
ctaatacagt tttttggggg cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc cttaaaggag 300
cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa 360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 420
cacaccgccc gcgcttaatg cgcgcgtaca gggcgcgctc cattcgccat tcaggctgcg 480
caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540
gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggtt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg 600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaaat tgggtaccgg 660
gccccccctc gagtctagaa ctagtggtac cccgacgccg aagtggagcc gacagcccc 720
aggtcccaag ccctcggcag actagatcac tagccctgga tcggcgaggt gactggatga 780
cgagcagcac ctggtctggc ggggtgttgg cgagtagaac caggggcgat ggcgacgcgc 840
tgaccttctc ccctcaccgg cgatctgctc cttctgggtg ggggtcgccg gctgacgttc 900
tgttgceggg tgggggtcgc cggctggcgt tctgctgcgg ggtgggagtc gccgaccggc 960
gtgctgctgc taggacaatc ggtgaggcca gttaggtgct agccgatcga ttggcgaaga 1020
gatccgagtc ctggggagat cagtgaggcc aggtgctatt tggcctatca attggccagg 1080
ttctgggaac ggggcgtggc gtgatcaacg aggtgctagg ctgctagcta gggaaactgga 1140
tcctggaacg tggaggaggc aagtcgggta tgctaagtac tttaactttc cttcttcaca 1200
tccacctgat tcagattatt ttgatctaaa ttaacttgca aaaaatatat gtgtgatata 1260
catctactat aattgcttac aatcaaaatt atatgtgatt ttttttagtt tagaagattt 1320
atatgcacag taaatctgaa tgttcttcac atgcatgatt tagtttaact ttaaagagtt 1380
atactaacta gtcttgataa agagatcttt tggagcaaca ccaaactcg tgaggtgttt 1440
tgcctacgga aaggttggtc tatgtaatga ttattattag gatcaaagtt gtaggataaa 1500
cgtaaaacct tctcgatgta tcttttatac aacattgtag tttagttata tatggagaga 1560
gtgatttaac actttgtgtt taagagtaga ataagttatt ccacactcta gccaaacgaa 1620
ctattttgca aatatctcgc tagctgggtg gagccagagc cgtggaaagt ctgtcttgct 1680
attaaggcac aagcatcaaa caggaacatt tagagccatg gaaaagtgat gtgtcgctta 1740
ccaatgggcc aactgctagc gatgtaataa tagcatccaa gttgattttt tatagaacat 1800
gcaaggcggt ggcaagtggg aaaatgattg atcgctggca agcttaactc tcggaactta 1860
tagcattcaa ctgaatcaga acaaagatta aaaaaaata catttccatc gatagtga 1920

```



aattattcaa	ttgagtgaca	acgaaaatca	tattggaatg	tacatttact	tgttgatttt	1980
aaattagagg	cattttttcta	ccttttttag	ttaataagat	atgcatatac	ccacccttag	2040
tgttttcgag	acaacgagag	ggcacattgc	ttttggtgct	accatctctc	tcaagcctca	2100
aataagttgt	gcggacacga	ttatcttccc	gcgttggaat	atcgtggcct	ggtagagcta	2160
gcgaaaaatc	ttccatgttg	gaatatgtcg	gcagccggat	agccgccatg	catgtaaagt	2220
ctctttttacc	tttacacttg	ctcaagtgc	actgtatgtc	gcctaccact	tgctaaatca	2280
atgggccaac	tgctagcgac	gtaatagtag	caagttgatt	tacagtgttt	tgctacagtt	2340
ctctgacttt	gtttcttcat	tttagactag	ctgactactg	tcgcttacct	gccttccctt	2400
ctccacgtta	gaggatccag	ttctgatatt	gagacctcga	cgatgggagg	aaggggcgca	2460
tcgatgtgga	gtaatttgaa	tttcaaactc	atctatctgg	ggtatatagg	tccttcaccg	2520
atgtttgggg	ggctgtcgga	aattgggtcc	gcgatctaca	aaagtgaatg	gagggagtag	2580
ttgtttctcc	aatccgtacc	aacgcacgtg	tttctaacta	gtacttactt	ccttcgcacc	2640
acaatatgga	atagagggag	tatcgataaa	ctaacaaaga	tgattactta	cccggtttaa	2700
atgattcaag	agctcattta	atgtggcact	catcatttca	tatatctttt	ttggtagaaa	2760
tgaaataaag	cagatctaga	cactagctaa	aaagtcgatg	tagccttggt	atttccttgg	2820
gccacgcggg	ccgggtgtgg	tgctccctgc	tctgtgtata	aatggagatc	aacatccaag	2880
gcctcctccc	acacacacac	gctacagagc	agagcagagt	cttgctccag	tatctgccct	2940
ctcctgcctg	cctgtagagc	atccatcacg	tgaagttcac	ggacaaacta	cgtacacagg	3000
cagctagctc	tcgaaacctc	gctcgaaacg	cacctgcaga	tcgctctctt	cgtcgtcgtc	3060
gccgcgatca	tcatacaacg	ctccgtctgc	cttgaggcca	cggccgtcca	cgacgccgcc	3120
gcctcaggte	agtcgtcgga	cggtgtccgt	tcatttccctc	cccatTTTTg	taattgatta	3180
acttgttata	catgctgacc	tcgacctgct	gaataacgtc	cgtccatggg	ttcccgtcca	3240
ggcaccocgg	gctgcaggaa	ttcaccacca	caccactcca	ccagtaagaa	gtgcagcagg	3300
tagctagtaa	gccggcgtag	ctttgctctt	gcagctagct	agctaaccat	ggccgcctct	3360
gcctcttgcc	tttctcttgt	ggtgctcgtg	gctctggcca	cggcggcgtc	ggcgagctg	3420
tcaccgacct	tctacgacac	gtcctgcccc	agggccctgg	ccatcatcaa	gagtggcgct	3480
atggccgccg	tgagcagcga	ccctcggatg	ggcgcgctgc	tgctccggct	gcacttccac	3540
gactgcttcg	tccaaggctg	cgacgcgtct	gttttgctgt	ctggcatgga	acaaaatgct	3600
atcccgaacg	cggggctcgt	gaggggcttc	ggcgtcatcg	acagcatcaa	gacgcagatc	3660
gaggccatct	gcaatcagac	cgtctcctgc	gccgacatcc	tcaccgtcgc	cgcccgtgac	3720
tccgttgtag	ccctcggagg	gccgtcatgg	acagtccttc	tggggagaag	agattccaca	3780
gatgcaaacg	aggcggcggc	aaacagcgac	ctgccaggct	ttacatctag	ccggtcagat	3840
cttgagctgg	cattcagaaa	caagggcctc	cttaacgatc	acatgggtgg	cctctcgggc	3900
gcgcacacca	tcggccaggc	gcagtgtggg	acctttaagg	acaggatcta	caatgagact	3960
aacatcgaca	cggccttcgc	cacatctctc	cggggccaact	gccccaggte	aaacggcgac	4020
gggagcctgg	cgaacctgga	cacgacgacg	gccaacacgt	tcgataacgc	ctactacacc	4080
aacctcatgt	cacagaaggg	gctcctgcac	tcggaccagg	tgctgttcaa	caacgacacc	4140
accgacaaca	ctgtccggaa	ctttgcgtcg	aaccacagcg	cgttcagcag	cgccttcacg	4200
accgccatga	tcaagatggg	caacatcgcg	ccgaagacag	gcacgcaggg	gcagatcagg	4260
ctcagctgct	ccagggtgaa	ctcgtgattg	atagacgagt	tactgcatac	tagccagcac	4320
gacacgtacg	tgaatgaata	aggccacaga	accagtggcc	aatataaata	ccagctcttg	4380
aaaccgtgta	ttttatgtac	gagtagcagc	aaatcatgca	tgcatctaca	catatatatg	4440
taacgatcga	attcccactt	tctcatgcaa	aggcatggag	aattactatc	aatcttagtt	4500
atacgtgtat	aaaaagcggc	cgcgaattcg	atatcaagct	tatcgatacc	gtcgacctcg	4560
acctgcaggc	atgcccgctg	aatcaccag	tctctctcta	caaatctatc	tctctctata	4620
ataatgtgtg	agtagttccc	agataaggga	attagggttc	ttataggggt	tcgctcatgt	4680
gttgagcata	taagaaaccc	ttagtatgta	tttgatattg	taaaataactt	ctatcaataa	4740
aattttcta	tcctaaaacc	aaaatccagg	ggtaccgagc	tcgaattcta	gtctacgcgg	4800
ccgcgagctc	cagcttttgt	tcccttttagt	gagggttaat	tgccgccttg	gcgtaatcat	4860
ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaaattgtt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	4920
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaattgagt	gagctaactc	acattaattg	4980
cgttgcgctc	actgcccgtc	ttccagtcgg	gaaacctgtc	gtgccagctg	cattaatgaa	5040
tcggccaacg	cgcggggaga	ggcggtttgc	gtattgggag	ctcttccgct	tcctcgctca	5100
ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggt	atcagctcac	tcaaaggcgg	5160
taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	5220
agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	5280
cccctgacga	gcatacacia	aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	5340
tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	5400
tgccgcttac	cggataacctg	tccgcctttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	5460
gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggctggtcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	5520
acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	5580
accgcgtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	5640
cgaggtatgt	aggcgggtgct	acagagttct	tgaagtggtg	gcctaactac	ggctacacta	5700

```

gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 5760
gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 5820
agcagattac ggcagaaaaa aaaggatctc aagaagatcc ttgatcttt tctacggggt 5880
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 5940
ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat 6000
atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga 6060
tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac 6120
gggagggtt accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccg 6180
ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg 6240
caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt 6300
cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgt 6360
cgtcgttttg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat 6420
cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta 6480
agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca 6540
tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 6600
agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat acegegccac 6660
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttccggggcg aaactctcaa 6720
ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt 6780
cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg 6840
caaaaaagg aataaggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 6900
attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 6960
agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtcca c 7011

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 746

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum sp.

&lt;400&gt; 6

```

agcttattac atagcaagca tgggggtactc caaaacccta gtagctggcc tgttcgcaat 60
gctgttacta gctccggccg tcttgccac cgaccagac cctctccagg acttctgtgt 120
cgccgacctc gacggcaagg cggctcgggt gaacgggcac acgtgcaagc ccatgtcgga 180
ggccggcgac gacttctct tctcgtccaa gttggccaag gccggcaaca cgtccacccc 240
gaacggctcc gcggtgacgg agctcgacgt ggccgagtgg ccggtacca acacgctggg 300
tgtgtccatg aaccgcgtgg actttgctcc cggaggcacc aaccaccac acatccaccc 360
gcgtgccacc gagatcggca tcgtgatgaa aggtgagctt ctggtggaa tccttggcag 420
cctcgactcc ggaacaagc tctactcgag ggtggtgccc gccggagaga cgttcctcat 480
cccacggggc ctcatgcact tccagttcaa cgtcggtaag accgaggcct ccatggtcgt 540
ctccttcaac agccagaacc ccggcattgt ctctgtgcc ctcacgctct tcggctccaa 600
cccgcccatc ccaacgccg tgctcaccaa ggcactccgg gtggaggcca gggctcgtga 660
acttctcaag tccaagtttg ccgctgggtt ttaatttcta ggagccttcc ctgaaatgat 720
aattatataa ttccatatat gcatgc 746

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 6452

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum sp.

&lt;400&gt; 7

```

ctaaattgta agcgttaata ttttggtaaa attcgcgtta aatttttggt aaatcagctc 60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
gatagggttg agtggtgttc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
ctaatacaagt tttttggggg cgaggtgccc taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag 300
cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa 360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 420
cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcg 480
caactgtttg gaaggcgat cgggtgcggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540
gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg ttttcccagt cagcagcttg 600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg 660
gccccccctc gagtctagaa ctagtgatc cccgacgccg aagtggagcc gacagcccc 720

```

aggtcccaag	ccctcggcag	actagatcac	tagccctgga	tcggcgaggt	gactggatga	780
cgagcagcac	ctggtctggc	gggtgttggg	cgagtagaac	caggggcgat	ggcgacgcgc	840
tgaccttctc	ccctcaccgg	cgatctgctc	cttctgggtg	ggggtcgccg	gctgacgttc	900
tggttgcggg	tgggggtcgc	cggctggcgt	tctgctgcgg	ggtgggagtc	gccgaccggc	960
gtgctgctgc	taggacaatc	ggtgaggcca	gttaggtgct	agccgatcga	ttggcgaaga	1020
gatccgagtc	ctggggagat	cagtgaggcc	aggtgctatt	tggcctatca	attggccagg	1080
ttctgggaac	ggggcgtggc	gtgatcaacg	aggtgctagg	ctgctagcta	gggaactgga	1140
tcctggaacg	tggaggaggc	aagtccggta	tgctaagtac	tttaactttc	cttcttcaca	1200
tccacctgat	tcagattatt	ttgatctaaa	tttaacttgca	aaaaatata	gtgtgatata	1260
catctactat	aattgcttac	aatcaaaatt	atatgtgatt	tttttttagtt	tagaagattt	1320
atatgcacag	taaatctgaa	tgttcttcac	atgcatgatt	tagtttaact	ttaaagagtt	1380
atactaacta	gtcttgataa	agagatcttt	tggagcaaca	ccaaacctcg	tgaggtgttt	1440
tgcctacgga	aagggtgtgc	tatgtaatga	ttattattag	gatcaaagtt	gtaggataaa	1500
cgtaaaacct	tctcgatgta	tctttttatac	aacattgtag	tttagttata	tatggagaga	1560
gtgatttaac	actttgtgtt	taagagtaga	ataagttatt	ccacactcta	gccaaacgaa	1620
ctatttggca	aatatctcgc	tagctgggtga	gagcagagtc	cggtggaaagt	ctgtcttgc	1680
attaaggcac	aagcatcaaa	caggaacatt	tagagccatg	gaaaagtgat	gtgtcgccta	1740
ccaatgggcc	aactgctagc	gatgtaataa	tagcatccaa	gttgattttt	tatagaacat	1800
gcaaggcgtt	ggcaagtggg	aaaatgattg	atcgctggca	agcttaactc	tcggaactta	1860
tagcattcaa	ctgaatcaga	acaaagatta	aaaaaaaaata	catttccatc	gatagtga	1920
aattattcaa	ttgagtgaca	acgaaaatca	tattggaatg	tacatttact	tgttgatttt	1980
aaattagagg	cattttttcta	ccttttttag	tttaataagat	atgcataatac	ccacccttag	2040
tgttttcgag	acaacgagag	ggcacattgc	ttttgggtgct	accatctctc	tcaagcctca	2100
aataagttgt	gcggaacaga	ttatcttccc	gcgttggaat	atcggtggcct	ggtagagcta	2160
gcgaaaaatc	ttccatgttg	gaatatgtcg	gcagccgat	agccgccatg	catgtaaagt	2220
ctcttttacc	tttacacttg	ctcaagtgc	actgtatgtc	gcctaccact	tgctaaatca	2280
atgggccaac	tgctagcgac	gtaatagtag	caagttgatt	tacagtgttt	tgctacagtt	2340
ctctgacttt	gtttcttcat	tttagactag	ctgactactg	tcgcttacct	gccttccctt	2400
ctccacgtta	gaggatccag	ttctgatatt	gagacctcga	cgatgggagg	aagggcgcga	2460
tcgatgtgga	gtaatttgaa	tttcaaactct	atctatctgg	ggtatattgg	tccttcaccg	2520
atgtttgggg	ggctgtcgga	aattgggtcc	gcgatctaca	aaagtgaatg	gagggagtag	2580
ttgtttctcc	aatccgtacc	aacgcacgtg	tttctaacta	gtacttactt	ccttcgcacc	2640
acaatatgga	atagagggag	tatcgataaa	ctaacaaaga	tgattactta	cccggtttaa	2700
atgattcaag	agctcattta	atgtggcact	catcatttca	tatatctttt	ttggtagaaa	2760
tgaaataaag	cagatctaga	cactagctaa	aaagtcgatg	tagccttggt	atttccttgg	2820
gccacgcggg	ccgggtgtgg	tgctccctgc	tctgtgtata	aatggagatc	aacatccaag	2880
gcctcctccc	acacacacac	gctacagagc	agagcagagt	cttgctccag	tatctgccct	2940
ctcctgcctg	cctgtagagc	atccatcacg	tgaagttcac	ggacaaacta	cgtacacagg	3000
cagctagctc	tcgaaacctc	gctcgaaacg	cacctgcaga	tcgctctctt	cgctcgtcgc	3060
gccgcgatca	tcacacacag	ctccgtctgc	cttgaggcca	cgcccgctca	cgacgcgcgc	3120
gcctcaggtc	agtcgtcgga	cgggtgtcgt	tcatttcttc	ccattttttg	taattgatta	3180
acttggtata	catgctgacc	tcgacctgct	gaataacgtc	cgtccatggg	ttcccgtcca	3240
ggcaccocgg	gggatccagc	ttattacata	gcaagcatgg	ggtactccaa	aaccctagta	3300
gctggcctgt	tcgcaatgct	gttactagct	ccggccgtct	tggccaccga	cccagaccct	3360
ctccaggact	tctgtgtcgc	cgacctcgac	ggcaaggcgg	tctcggtgaa	cgggcacacg	3420
tgcaagccca	tgtcggaggc	cggcgacgac	ttcctcttct	cgtccaagtt	ggccaaggcc	3480
ggcaacacgt	ccaccccgaa	cggctccgcc	gtgacggagc	tcgacgtggc	cgagtggccc	3540
ggtaccaaca	cgctgggtgt	gtccatgaac	cgcgtggact	ttgctcccgg	aggcaccaac	3600
ccaccacaca	tcaccccgcg	tgccaccgag	atcggcacgc	tgatgaaagg	tgagcttctc	3660
gtgggaatcc	ttggcagcct	cgactccggg	aacaagctct	actcgagggt	ggtgcgcgcc	3720
ggagagacgt	tcctcatccc	acggggcctc	atgcacttcc	agttcaacgt	cggtaagacc	3780
gaggcctcca	tggtcgtctc	cttcaacagc	cagaaccccg	gcattgtctt	cgtgcccctc	3840
acgctcttcg	gctccaaccc	goccatccca	acgcgggtgc	tcaccaaggc	actccgggtg	3900
gaggccaggg	tcgtggaact	tctcaagtcc	aagtttgccg	ctgggtttta	atttctagga	3960
gccttccctg	aaatgataat	tatataatcc	catatatgca	tgccctgcagg	catgcccgct	4020
gaaatcacca	gtctctctct	acaaatctat	ctctctctat	aataatgtgt	gagtagttcc	4080
cagataaggg	aattagggtt	cttatagggt	ttcgtctcatg	tggtgagcat	ataagaaacc	4140
cttagtatgt	atttgtattt	gtaaaatact	tctatcaata	aaatttctaa	ttcctaaaac	4200
caaaatccag	gggtaccgag	ctcgaattct	agtctacgcg	gccgcgagct	ccagcttttg	4260
ttccctttag	tgagggttaa	ttgcgcgctt	ggcgtaatca	tggtcatagc	tgtttctctg	4320
gtgaaattgt	tatccgctca	caattccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	4380
agcctggggg	gcctaattgag	tgagctaact	cacattaatt	gcgttgcgct	cactgcccgc	4440
tttccagtcg	ggaaacctgt	cgtgccagct	gcattaatga	atcggccaa	gcgcggggag	4500



```

aggcgggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttctctcgctc actgactcgc tgcgctcggt 4560
cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 4620
atcaggggat aacgcaggaa agaacaatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 4680
taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca 4740
aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 4800
tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 4860
gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 4920
cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 4980
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc aacccggtaa gacacgactt 5040
atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg taggcgggtg 5100
tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 5160
ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 5220
acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 5280
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 5340
aaactcacgt taagggatth ttggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 5400
tttaaatata aaatgaagtt ttaaatcaat cttaagtata tatgagtaaa cttgggtctga 5460
cagttaccaaa tgcttaataca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttctgtctatc 5520
catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 5580
ccccagtgc gcaatgatac cgcgagaccc acgtcacccg gctccagatt tatcagcaat 5640
aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 5700
ccagtctatt aattgttgcc ggggaagctag agtaagtagt tccgagttta atagtttgcg 5760
caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tctcgtttg gtatggcttc 5820
attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 5880
agcggttage tcttcgggc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 5940
actcatgggt atggcagcac tgcataatc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 6000
ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 6060
ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 6120
gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 6180
atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 6240
cagcgtttct ggttgagcaa aaacaggaag gcaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 6300
gacacggaaa tgttgataac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 6360
gggttattgt ctcagtcagc gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 6420
ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc ac 6452

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1939

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum sp.

&lt;400&gt; 8

```

ccactgtcca cacgaaatgt gccatctgaa acgcgtttctg gaacagcgtc aggtgtatga 60
agaagaggac ccagtcgggg cggtggaacc agaagaactt gttgctgggc tgcaccacgg 120
gtgccccctt gatgacgctc gaccggtcct ggatctccag ggccatctcc atgatgatca 180
tctctagctt ggttccaaca cacaagagga tgatgagagg gatgaaagaa acccagggtga 240
gtgtgccgat ccgctcgata tcaaggaaga gggtaggat cgccacagcc cacagcggga 300
ggctgcgaaa agaggccaaa tgtgtcaaga tcatgcaaca aggaccagca ggggcaaaaga 360
ccatgacgca gcaaactgat agtattgtat catatggaag ctaagcaata tcatatggag 420
cctgacgaca ctcgtgccga attcgattcg tgaatttcta gagaacaaaa ggtatgcac 480
aatttagaaa aaagtacact attatgtgat gtttgtttcc tatgctagtg gaacggatta 540
gaattttttt ttcattaagg tcacctttac tggcataagc agttcacact aaacggtaaa 600
ccttatagggt gaaaattttc aggcataatat atatataatat atatataatat atgtttgatt 660
ctttccggct taacaaaata attagcaagt acttcttgtt gcattttgtt caacggctga 720
atltattggc atcgggtccaa gaaatccatc taaatgtttt acatttcacc aaagtgtgtg 780
tcatgacaga tgtaacaaat aataaaccaa aaggagagga aggaaagagg aagataaatg 840
ttacaaaaat ttaaatcaaa cttatttcta cctttctcct tacctacca gtttaaaaac 900
acatattata ttttaagag aggcaacatg cgccaaaggc tacccttgaa aattcctaaa 960
atattgtaca tttgactgat gaccaaaca aaagttaaat tgtctcttcc ttatcacatt 1020
atatttccat gcatgccttt ttctggaaac ttactatcag caaaatttag atgaaaggat 1080
aatgccacat aatttcagtc tccaagagat ttgttagttg tcatatatta aattgggtgg 1140
ccaatctatt cctgggtctt tttatgtatc tacttgacca tttgaacttc tgtagttaat 1200
tgtattctat gaatgatcac tcatccaaaa acttgttatt tgtgttttac tctgttgaat 1260
cttgaatatt tattcatttt gttcatcata cgattggagg ccataaatag atgcttaaatg 1320

```

```

agagtaagat tatcgatctc caaacacatg cttcttacta gtgttgaata tataacccttt 1380
tagatgtata gttcaaccca tagattcata tgaccctcag ctttctgatg tgtatgtatg 1440
accttacact gacactctga actaatgtag gtatcttgtc ctgcaggaat tcggcacgag 1500
tgtcgtcagg ctccatatga tattgcttag cttccatatg atacaatact atcagtttgc 1560
tgcgatcatg tctttgcccc tgctggctct tgttgcatga tcttgacaca tttggcctct 1620
tttcgcagcc tcccgctgtg ggctgtggcg atcctcaccc tcttccttga tatcgacggg 1680
atcggcacac tcacctgggt ttctttcatc cctctcatca tctctctgtg tgttggaacc 1740
aagctagaga tgatcatcat ggagatggcc ctggagatcc aggaccggtc gagcgatcat 1800
aagggggcac ccgtggctga gccagcaaac aagttcttct ggttcacccg ccccgactgg 1860
gtcctcttct tcatacacct gacgctgttc cagaacgcgt ttcagatggc acatttcgtg 1920
tggacaggca tgcgactgg 1939

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 7633

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum sp.

&lt;400&gt; 9

```

ctaaattgta agcgtaata ttttgttaaa attcgcgta aatttttgtt aaatcagctc 60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
gatagggttg agtggtgttc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
ctaatacagt tttttggggg cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag 300
ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aaggggaaga 360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 420
cacaccgcc gcgcttaatg cgcgcctaca gggcgcgctc cattcgccat tcaggctgcg 480
caactgttgg gaaggcgat cgggtgcggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg 600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg 660
gccccccctc gagtctagaa ctagtgatc cccgacgccg aagtggagcc gacagcccc 720
aggtcccaag ccctcggcag actagatcac tagccctgga tcggcgaggt gactggatga 780
cgagcagcac ctggtctggc ggggtgttgg cgagtagaac caggggcgat ggcgacgcgc 840
tgaccttctc ccctcaccgg cgatctgctc cttctgggtg ggggtcgccg gctgacgttc 900
tgttgccggg tgggggtcgc cggctggcgt tctgctgcgg ggtgggagtc gccgaccggc 960
gtgctgctgc taggacaatc ggtgaggcca gttaggtgct agccgatcga ttggcgaaga 1020
gatccgagtc ctggggagat cagtgaggcc aggtgctatt tggcctatca attggccagg 1080
ttctgggaac ggggcgtggc gtgatcaacg aggtgctagg ctgctagcta gggaactgga 1140
tcctggaacg tggaggaggc aagtccggtg tgctaagtac ttttaactttc cttcttcaca 1200
tccacctgat tcagattatt ttgatctaaa ttaacttgca aaaaatatat gtgtgatata 1260
catctactat aattgcttac aatcaaaatt atatgtgatt ttttttagtt tagaagattt 1320
atatgcacag taaatctgaa tgttcttcac atgcatgatt tagtttaact ttaaagagtt 1380
atactaacta gtcttgataa agagatcttt tggagcaaca ccaaacctcg tgagggtgtt 1440
tgccacgga aaggttgtgc tatgtaatga ttattattag gatcaaagtt gtaggataaa 1500
cgtaaaacct tctcgatgta tcttttatac aacattgtag tttagttata tatggagaga 1560
gtgatttaac actttgtgtt taagagtaga ataagttatt ccactacta gccaaacgaa 1620
ctatttggca aatatctcgc tagctgggtg gagccagagc cgtggaaagt ctgtcttget 1680
attaaggcac aagcatcaaa caggaaacatt tagagccatg gaaaagtgat gtgtcgcta 1740
ccaatgggcc aactgctagc gatgtaataa tagcatcaa gttgattttt tatagaacat 1800
gcaaggcgtt ggcaagtggg aaaatgattg atcgctggca agcttaactc tcggaactta 1860
tagcattcaa ctgaatcaga acaaagatta aaaaaaata catttccatc gatagtga 1920
aattattcaa ttgagtgaac acgaaaatca tattggaatg tacatttact tgttgatttt 1980
aaattagagg catttttcta ccttttttag ttaataagat atgcatatac ccaccttag 2040
tgttttcgag acaacgagag ggcacattgc ttttggtgct accatctctc tcaagcctca 2100
aataagttgt gcggacacga ttatcttccc gcgttggaat atcgtggcct ggtagagcta 2160
gcgaaaaatc ttccatgttg gaatatgtcg gcagccgat agccgccatg catgtaaagt 2220
ctcttttacc tttaacttg ctcaagtga actgtatgtc gcctaccact tgctaaatca 2280
atgggccaac tgctagcgac gtaatagtag caagttgatt tacagtgttt tgctacagtt 2340
ctctgacttt gtttcttcat tttagactag ctgactactg tcgcttacct gccttccctt 2400
ctccacgtta gaggatccag ttctgatatt gagacctcga cgatgggagg aagggcgcca 2460
tcgatgtgga gtaatttgaa tttcaaatct atctatctgg ggtatattgg tcttccaccg 2520
atgtttgggg ggctgtcgga aattgggtcc gcgatctaca aaagtgaatg gagggagtag 2580
ttgtttctcc aatccgtacc aacgcacgtg tttctaacta gtacttactt ccttcgcacc 2640

```

acaatatgga	atagagggag	tatcgataaa	ctaacaaaga	tgattactta	cccggtttaa	2700
atgattcaag	agctcattta	atgtggcact	catcatttca	tatatctttt	ttggtagaaa	2760
tgaaataaag	cagatctaga	cactagctaa	aaagtcgatg	tagccttggt	atttccttgg	2820
gccacgcggg	ccgggtgtgg	tgctccctgc	tctgtgtata	aatggagatc	aacatccaag	2880
gcctcctccc	acacacacac	gctacagagc	agagcagagt	cttgcctccag	tatctgccct	2940
ctcctgcctg	cctgtagagc	atccatcacg	tgaagttcac	ggacaaacta	cgtacacagg	3000
cagctagctc	tcgaaacctc	gctcgaaaacg	cacctgcaga	tcgctctctt	cgtcgtcgtc	3060
gccgcgatca	tcatacaacag	ctccgtctgc	cttggagcca	cggccgtcca	cgacgccgcc	3120
gcctcaggte	agtcgtcggg	cggtgtccgt	tcatttcttc	cccatttttg	taattgatta	3180
acttggtata	catgctgacc	tcgacctgct	gaataacgtc	cgtccatggg	ttcccggtcca	3240
ggcaccgccg	gccactgtcc	acacgaaatg	tgccatctga	aacgcgttct	ggaacagcgt	3300
cagggtgtatg	agaagagga	cccagtcggg	gcgggtggaac	cagaagaact	tggtgctggg	3360
ctcgaccacg	ggtgccccct	tgatgacgct	cgaccggtcc	tggtatctcca	gggccatctc	3420
catgatgatc	atctctagct	tggttccaac	acacaagagg	atgatgagag	ggatgaaaga	3480
aacccagggtg	agtgtgccga	tcccgctcgat	atcaagggaag	agggtgagga	tcgccacagc	3540
ccacagcggg	aggctgcgaa	aagaggccaa	atgtgtcaag	atcatgcaac	aaggaccagc	3600
aggggcaaag	accatgacgc	agcaaactga	tagtattgta	tcatatggaa	gctaagcaat	3660
atcatatgga	gcctgacgac	actcgtgccg	aattcgattc	gtgaatttct	agagaacaaa	3720
aggatatgat	caatttagaa	aaaagtacac	tattatgtga	tggttggttc	ctatgctagt	3780
ggaacggatt	agaatttttt	tttcatttaag	gtcaccttta	ctggcataag	cagttcacac	3840
taaacggtaa	accttatagg	tgaaaatttt	caggcatata	tatatatata	tatatatata	3900
tatgtttgat	tctttccggc	ttaaacaaaat	aattagcaag	tacttcttgt	tgcatttggt	3960
ccaacggctg	aattttattgg	catcgggtcca	agaaatccat	ctaaatgttt	tacatttcac	4020
caaagtgtgt	gtcatgacag	atgtaacaaa	taataaacca	aaaggagagg	aaggaaagag	4080
gaagataaat	gttacaaaaa	tttaaatacaa	acttatttct	acctttctcc	ttacctacc	4140
agtttaaaaa	cacatattat	attttaaaaga	gaggcaacat	gcgccaaaag	ctacccttga	4200
aaattcctaa	aatattgtac	atttgactga	tgaccaaaca	aaaagttaaa	ttgtctcttc	4260
cttatcacat	tatatattcca	tgcatgcctt	tttctggaaa	cttactatca	gcaaaattta	4320
gatgaaagga	taatgccaca	taatttcagt	ctccaagaga	tttggttaggt	gtcatatat	4380
aaattggtgg	gccaatctat	tcctgggtct	ttttatgtat	ctacttgacc	atttgaactt	4440
ctgtagttaa	ttgtattcta	tgaatgatca	ctcatccaaa	aacttgttat	ttgtgtttta	4500
ctctgttgaa	tcttgaatat	ttattcattt	tgttcatcat	acgattggag	gcccataata	4560
gatgcttaat	gagagtaaga	ttatcgatct	ccaaacacat	gcttcttact	agtgttgaat	4620
atataccctt	ttagatgtat	agttcaaccc	atagattcat	atgaccctca	gctttctgat	4680
gtgtatgtat	gaccttacac	tgacactctg	aactaatgta	ggtatcttgt	cctgcaggaa	4740
ttcggaacga	gtgtcgtcag	gctccatatg	atattgctta	gcttccatat	gatacaatac	4800
tatcagtttg	ctgcgtcatg	gtctttgccc	ctgctgggtcc	ttgttgcatg	atcttgacac	4860
atttggcctc	ttttcgcagc	ctcccgtgtg	gggctgtggc	gatcctcacc	ctcttccttg	4920
atatcgacgg	gateggcaca	ctcacctggg	tttctttcat	ccctctcatc	atcctcttgt	4980
gtgttggaac	caagctagag	atgatcatca	tgagatgggc	cctggagatc	caggaccggt	5040
cgagcgtcat	caagggggga	cccgtgggtcg	agcccagcaa	caagttcttc	tggttccacc	5100
gccccgactg	ggtcctcttc	ttcatacacc	tgacgtgtgt	ccagaacgcg	tttcagatgg	5160
cacattcteg	gtggacaggc	atgegactgg	geatgccgcg	tgaaatcacc	agtctctctc	5220
tacaaatcta	tctctctcta	taataatgtg	tgagttagttc	ccagataagg	gaattagggg	5280
tcttataggg	tttcgctcat	gtgttgagca	tataagaaac	ccttagtatg	tatttgtatt	5340
tgtaaaatac	ttctatcaat	aaaattttcta	attcctaaaa	ccaaaatcca	ggggtaccga	5400
gctcgaattc	tagtctacgc	ggccgcgagc	tccagctttt	gttcccttta	gtgagggtta	5460
attgcgcgct	tggcgtaatc	atgggtcatag	ctgtttcctg	tgtgaaattg	ttatccgctc	5520
acaattccac	acaacatacg	agccggaagc	ataaagtgtg	aagcctgggg	tgccataatga	5580
gtgagctaac	tcacattaat	tgcggtgcgc	tcactgcccg	ctttccagtc	gggaaacctg	5640
tcgtgccagc	tgcattaatg	aatcggccaa	cgcgcgggga	gaggcgggtt	gcgtattggg	5700
cgctcttccg	cttccctcgt	cactgactcg	ctgcgctcgg	tcgttcgggt	gcggcgagcg	5760
gtatcagctc	actcaaaggc	ggtaatacgg	ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	5820
aagaacatgt	gagcaaaagg	ccagcaaaag	gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgcggttgctg	5880
gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcag	5940
aggtggcgaa	accgcacagg	actataaaga	taccaggcgt	ttccccctgg	aagctccctc	6000
gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgccgctt	accggatacc	tgctccgctt	tctcccttcg	6060
ggaagcgtgg	cgctttctca	tagctcacgc	tgtaggtatc	tcagttcggg	gtaggtcgtt	6120
cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaaccc	cccgttcagc	ccgaccgctg	cgccttatcc	6180
ggtaactatc	gtcttgagtc	caaccgggta	agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	6240
actggtaaca	ggattagcag	agcgagggtat	gtaggcgggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	6300
tggcctaact	acggctacac	tagaaggaca	gtatttggtg	tctgcgctct	gctgaagcca	6360
gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	tgatccggca	aacaaaccac	cgctggtagc	6420



10/11

```
ggtgggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat 6480
cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt 6540
ttggatcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt 6600
tttaaatacaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc 6660
agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc 6720
gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gcccagtgcc tgcaatgata 6780
ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg 6840
gccgagcgca gaagtgggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattggtgc 6900
cggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct 6960
acaggcatcg tgggtgtcacg ctcgctcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa 7020
cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcgggttag ctccttcggt 7080
cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca 7140
ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac 7200
tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctca 7260
atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt 7320
tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc 7380
actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca 7440
aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata 7500
ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc 7560
ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc 7620
cgaaaagtgc cac 7633
```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Adaptor-Primer

&lt;400&gt; 10

atatatctgc agggagccac ggccgtccac

30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Adaptor-Primer

&lt;400&gt; 11

tatcccgggc ccgtgcctgg acgggaa

27

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Adaptor-Primer

&lt;400&gt; 12

atatatctcg agtctagaac tagtggatcc

30

&lt;210&gt; 13

<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Adaptor-Primer

<400> 13  
atatattacg tagtttgtcc gtgaacttca

30

<210> 14  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 14  
gtacacaggc agctagctct cgaaacctcg ctcgaaacgc a

41

<210> 15  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 15  
catgtgtccg tcgatcgaga gctttggagc gagctttgcg t

41

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No  
PCT/EP2004/011214

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAUCH F. ET AL: "differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and pathogen attack" PLANT PHYSIOL, vol. 102, 1993, pages 1193-1201, XP002313139	1-26
A	XU F. ET AL: "tandemly duplicated safener induced glutathione s-transferase genes from triticum tauschii contribute to genome and organe-specific expression in hexaploid wheat" PLANT PHYSIOL, vol. 130, 2002, pages 362-373, XP002313140	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

**\* Special categories of cited documents:**

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 2005

Date of mailing of the international search report

01/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Keller, Y



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**